



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«Μελέτη της απόκρισης γευστικών υποδοχέων του δάκου
της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην ολεuropαΐνη»

Ελένη-Μαρία Αναστασίου



Λάρισα, Φεβρουάριος 2018

«Μελέτη της απόκρισης γευστικών υποδοχέων του δάκου
της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην ολευρωπαΐνη»

“Study of *Bactrocera oleae* gustatory receptors response to
oleuropein”

Τριμελής Επιτροπή

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής
Βιολογίας

Παπαδόπουλος Νικόλαος: Καθηγητής Γεωργικής
Εντομολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Βιοτεχνολογίας Φυτών

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Μαρτίου 2017 - Οκτωβρίου 2017 υπό την επίβλεψη του κ. Κ. Ματθιόπουλου, καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και της κ. Κ. Τσουμάνη, Διδάσκουσας Μοριακής Βιολογίας ΠΔ 407/80, καθώς και στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Εντομολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το διάστημα Δεκεμβρίου 2016 - Φεβρουαρίου 2017 υπό την επίβλεψη των Διευθυντή του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Εντομολογίας κ. Ν. Παπαδόπουλου και του κ. Γ. Κυρίτσης, Δρ. Γεωργικής Εντομολογίας.

Ευχαριστίες

Ξεκινώντας αυτό το μεταπτυχιακό ένιωθα αρκετά ανασφαλής προερχόμενη από συγγενικό αλλά διαφορετικό συνάμα κλάδο, αυτόν της Χημείας.

Και μιλώντας για χημεία, αυτή ήταν το κομβικό στοιχείο που με οδήγησε στην επιλογή του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και που τελικώς αποδείχθηκε σωστός οδηγός.

Ο κ. Ματθιόπουλος αποτελεί πράγματι έμπνευση για τους φοιτητές του, εξηγώντας με έναν απλό, περιγραφικό και ολοκληρωμένο τρόπο την Μοριακή Βιολογία, κάνοντας και τον πιο «άσχετο», «σχετικό».

Η κ. Τσουμάνη, έχοντας πάρει τα βασικά εργαλεία αυτά, αλλά αναπτύσσοντας και δικά της ήταν εκείνη που υπήρξε πάντα αρκετά δίπλα για να βοηθήσει και μακριά - κάποιες φορές - για να καταφέρει να αναπτύξουμε κι εμείς τη δική μας κριτική σκέψη και να καταφέρουμε να λύσουμε το πρόβλημα μόνοι μας.

Η Ελευθερία είναι ένα εκκολαπτόμενο «αστέρι» θα έλεγα του κλάδου αυτού και αν και προπτυχιακή, η βοήθειά της στα basics υπήρξε πολύτιμη.

Ο κ. Κυρίτσης ήταν ο πρώτος που με έφερε σε επαφή με τα τον *θαυμαστό κόσμο των εντόμων* και τον ευχαριστώ, όπως και τον κ. Παπαδόπουλο για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του.

Η συνεργασία ήταν πολύ καλή μέσα στο εργαστήριο, κάτι το οποίο οφείλεται και στη Μαριλένα που ήταν πάντα εκεί, τον Λευτέρη στον οποίο εύχομαι μία επιτυχή πορεία ως διδάκτορα, στην Ελένη, στην Ευγενία...

Εις το επανιδείν....

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί τον κύριο φυσικό εχθρό της ελιάς και παρόλη την εξέλιξη των χημικών φυτοπροστατευτικών ουσιών καθώς και των μεθόδων ολοκληρωμένης διαχείρισης, δεν έχει καταστεί δυνατή η πλήρης αντιμετώπισή του. Τα οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα αποτελούν κίνδυνο τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον, ενώ οι παγίδες μαζικής εξολόθρευσης δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές καθώς δεν αποτελούν ειδο-ειδικό τρόπο αντιμετώπισης του εντόμου αλλά προσβάλλουν κι άλλους οργανισμούς που θα μπορούσαν να αποτελέσουν φυσικό εχθρό του δάκου. Η μοριακή βιολογία προσδίδει μια εξαιρετικά ενδελεχή ματιά σε πτυχές της βιολογίας του δάκου που θα μπορούσαν να αναδείξουν νέους τρόπους αντιμετώπισής του, περισσότερο ειδο-ειδικούς και λιγότερο επιβλαβείς στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία.

Στην παρούσα διατριβή έγινε μια πρώτη προσπάθεια κατανόησης του πώς ο δάκος αντιλαμβάνεται την ελιά και την επιλέγει για να αφήσει τα αυγά του. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν γονίδια γευστικών υποδοχέων του δάκου, που είχαν προκύψει από πρότερη μελέτη του μεταγραφώματος του εντόμου, και μελετήθηκε η απόκρισή τους κατά την επαφή του εντόμου με την ολευρωπαΐνη που αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό του ελαιόκαρπου. Η απόκριση των γευστικών υποδοχέων μελετήθηκε στον ωοθέτη, μέσω του οποίου ο δάκος βρίσκει το κατάλληλο υπόστρωμα ωοαπόθεσης, και τα στοματικά μόρια, μέσω των οποίων ανευρίσκει την τροφή. Ως ιστός ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο θώρακας, ο οποίος δεν αναμένεται να παρουσιάζει ιδιαίτερη γευστική δραστηριότητα. Η έρευνά μας έδειξε ότι μόνο στον πιο κρίσιμο - για την αναπαραγωγή - ιστό (ωοθέτη) παρουσιάζεται υπερέκφραση των συγκεκριμένων γευστικών υποδοχέων που επιλέχθηκαν προς μελέτη.

Η αποκάλυψη της σπουδαιότητας των εν λόγω γευστικών υποδοχέων, όπως και άλλων γευστικών και οσφρητικών μελλοντικά, θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχεδιασμό και την κατασκευή ειδο-ειδικών προσελκυστικών παγίδων με σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του δάκου.

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, constitutes the main natural enemy of the olive tree. Despite the development of chemical pesticides and Integrated Pest Management methods, it has not yet been possible to fully address it. Organophosphate and pyrethroid insecticides pose a risk to both humans and the environment; mass traps are not particularly effective as they are not species-specific, but can also affect other organisms that could be a natural enemy of the fly. Molecular biology gives an extraordinary insight into aspects of *B. oleae* biology that could highlight new ways of dealing with it, more specific and less harmful to the environment and human health.

In the current research, it was attempted to understand how *B. oleae* perceives the olive fruit and chooses it for oviposition. For this reason, GRs of *B. oleae* were chosen after a meticulous transcript study on the fly. The response of particular GRs when they came in contact with a certain concentration of oleuropein (the main polyphenolic compound of the olive tree) was studied. The responsiveness of the GR receptors was studied in the ovipositor, through which the fly finds the appropriate oviposition substrate, and the maxillary palps through which it finds its food. The thorax was used as a control tissue, which is not expected to exhibit particular gustatory activity. Our research has shown that only the most critical - for reproduction - tissue (ovipositor) appears overexpression of the particular GRs.

The revelation of the importance of these GR receptors, as well as other gustatory and olfactory receptors in the future, could lead to the design and construction of species-specific traps in order to more effectively control the fly.

Περιεχόμενα

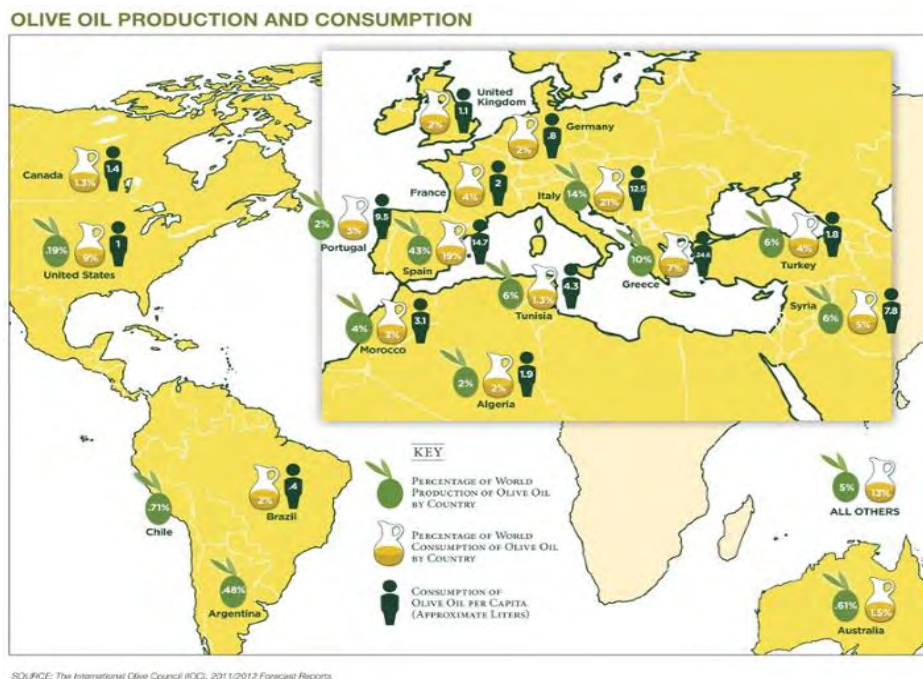
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Ελιά.....	1
1.1.1	Χημική σύσταση της ελιάς	1
1.1.2	Πολυφαινόλες	2
1.1.3	Ολευρωπαΐνη (oleuropein)	2
1.2	Ο δάκος της ελιάς.....	4
1.2.1	Κύκλος ζωής του εντόμου	4
1.2.2	Οικονομική σημασία του δάκου της ελιάς	4
1.3	Καταπολέμηση του δάκου	5
1.3.1	Χρήση εντομοκτόνων	5
1.3.2	Χρήση προσελκυστικών παγίδων.....	6
1.3.3	Ολοκληρωμένη διαχείριση εντόμων.....	7
1.3.4	Ειδοειδικότητα για τη βέλτιστη καταπολέμηση	7
1.4	Χημειοαντίληψη εντόμων	8
1.4.1	Φερομόνες.....	8
1.4.2	Αισθητήρια (Sensilla).....	8
1.4.3	Δενδρίτες	9
1.4.4	Τρόπος με τον οποίο αντιλαμβάνονται τα έντομα τις χημικές ουσίες.....	9
1.5	Χημειοϋποδοχείς.....	11
1.5.1	G Protein Coupled Receptors	12
1.5.2	Εξέλιξη οσφρητικών και γευστικών υποδοχέων.....	13
1.5.3	Γευστικοί υποδοχείς.....	13
1.6	Ωτοκία	16
1.6.1	Ωτοκία στο έντομο <i>B. oleae</i>	16
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	18
3	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	19
3.1	Πειραματικός σχεδιασμός.....	19
3.2	Απομόνωση RNA	20
3.3	Κατεργασία με DNase	21
3.4	Σύνθεση cDNA	22
3.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).....	22
3.6	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Polymerase chain reaction, RT-PCR)	25

3.7	Σχετική ποσοτικοποίηση	26
3.8	Ανάλυση έκφρασης	27
3.8.1	Απόδοση (Efficiency)	27
3.8.2	Στατιστική ανάλυση (GraphPad)	28
3.9	Βιοπληροφορική ανάλυση (Bioinformatics)	28
3.9.1	Omiga.....	28
3.9.2	Blast	28
3.9.3	MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)	29
3.9.4	TMHMM	29
3.9.5	MEGA	29
3.9.6	Fig Tree	31
3.9.7	PrimerQuest Tool & Oligonalyzer- IDT (Integrated DNA Technologies).....	31
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
4.1	Βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση γευστικών υποδοχέων	35
4.1.1	Ομολογία	35
4.1.2	Καθορισμός Διαμεμβρανικών περιοχών.....	35
4.2	Φυλογενετική ανάλυση.....	37
4.3	Έλεγχος ειδο-ειδικότητας (species specific).....	39
4.4	Έλεγχος απόκρισης στην ολεωρωπαΐνη	40
4.5	Ανάλυση έκφρασης	41
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
5.1	Μελλοντικές προοπτικές.....	61
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
7	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	68
7.1	Φυλογενετικό δέντρο	68
7.2	Εκκινητές	69
7.2.1	Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 53 γονιδίων που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς του <i>B. oleae</i>	69
7.2.2	Αμινοξικές αλληλουχίες των 53 γονιδίων που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς του <i>B. oleae</i>	72

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελιά

Η ελιά είναι ένα μεσαίου μεγέθους αιθαλές δέντρο, το οποίο ενσωματώνει ένα μοναδικό συνδυασμό των μορφολογικών και αναπτυξιακών χαρακτηριστικών που είναι κατάλληλα για τις σχετικά άνυδρες αγροτικές συνθήκες της μεσογειακής του προέλευσης. Ένα χαρακτηριστικό του ελαιόδεντρου είναι τα πολυάριθμα μικρά φρούτα του που είναι πλούσια σε ελαιόλαδο το οποίο εκτιμάται τόσο για τα γευστικά οφέλη, όσο και για την υγεία. Το είδος *Olea europaea* περιλαμβάνει τόσο άγριες όσο και καλλιεργήσιμες μορφές. Η μακρά περίοδος της εξημέρωσης του δέντρου και η αντίσταση των άγριων ποικιλιών σε δυσμενείς συνθήκες, είχε ως αποτέλεσμα την ανάδειξη ποικιλομορφίας μεταξύ των διαφόρων ελαιόδεντρων. Τα χαρακτηριστικά του δένδρου, όπως είναι το ύψος και η πυκνότητα της στεφάνης, και ακόμη το μέγεθος και το σχήμα των καρπών, σχετίζονται με τον γονότυπο. Επιπλέον, η ελιά είναι ένα δέντρο πολύ εύπλαστο στην ανάπτυξή του, και έτσι οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι γεωργικές πρακτικές διαχείρισης, και ιδίως το κλάδεμα και η άρδευση, επηρεάζουν σημαντικά τόσο το δέντρο όσο και τη μορφή των φρούτων (Raporport et al., 2016). Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, υπάρχει μεγάλο ποσοστό παραγωγής και κατανάλωσης ελαιολάδου και ελιάς σε παγκόσμια κλίμακα.



Εικόνα 1. Χάρτης ελαιοπαραγωγής και κατανάλωσης ελαιολάδου ανά χώρα παγκοσμίως (North American Olive Oil Association)

1.1.1 Χημική σύσταση της ελιάς

Πέρα από την οικονομική της σημασία, η ελιά έχει επίσης μεγάλη διατροφική σημασία. Είναι γνωστή για τη μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών νοσημάτων και σε κάποιες περιπτώσεις ευθύνεται για το σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης ορισμένων

τύπων νεοπλασιών, χάρη στα φαινολικά συστατικά που περιέχει και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυτών (Δρ Άρης Ξενάκης - Διευθυντής Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών - Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας). Το ελαιόλαδο που προέρχεται από την ελιά περιέχει κυρίως μονοακόρεστα (80%), πολυακόρεστα (7%) και κορεσμένα (10%) λιπαρά οξέα, πολυφαινόλες, πτητικά συστατικά σε ποσοστό 2%, σκουαλένιο και φυτοστερόλες σε ποσοστό 1%.

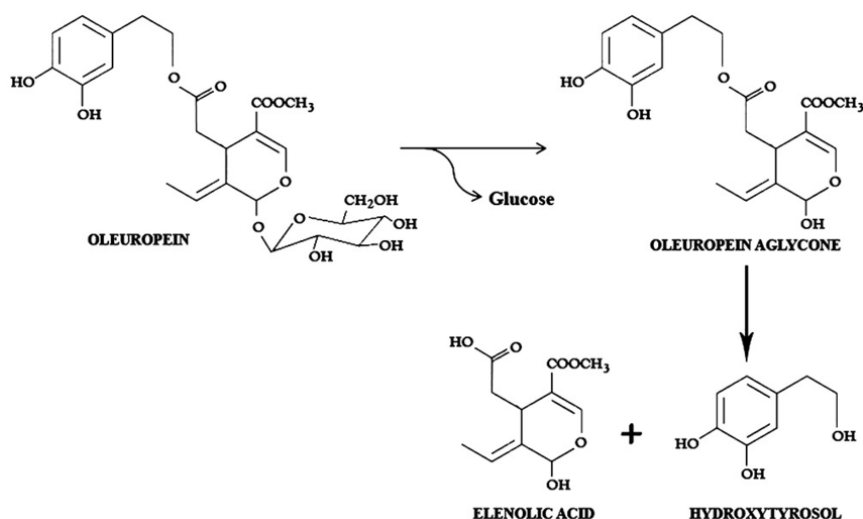
1.1.2 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς και ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά τους είναι: φαινολικό -OH, αρωματικός πυρήνας συχνά ετεροκυκλικός, ετεροκυκλικό οξυγόνο, συζευγμένο σάκχαρο (γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικά ή γαλακτουρονικά οξέα).

1.1.3 Ολευρωπαΐνη (oleuropein)

Το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς είναι η ολευρωπαΐνη (oleuropein). Η ολευρωπαΐνη ως ξεχωριστή ουσία ανακαλύφθηκε το 1908 από τους Bourquelot και Vintilescu στο ελαιόλαδο, οι οποίοι και της έδωσαν το χαρακτηριστικό της όνομα. Πολύ αργότερα, το 1960, οι Panizzi, Scarpati και Oriente υπέδειξαν ότι το μόριο της ουσίας αυτής περιέχει γλυκόζη, β-3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και ένα οξύ το οποίο είναι γνωστό ως ελενολικό οξύ (elenolic acid). Το οξύ αυτό ήταν ήδη γνωστό (παρασκευαζόταν με υδρόλυση εκχυλίσματος των ελαιοκάρπων με φωσφορικό οξύ) και είχε προταθεί από το 1962 ως φάρμακο κατά της υπέρτασης (Veer WLC, U.S. Patent 3,033,877) (Bourquelot et al., 1908; Guiso & Marra, 2005; Panizzi et al., 1960). Η ολευρωπαΐνη βρίσκεται στα φύλλα της ελιάς και στον ελαιόκαρπο. Η περιεκτικότητα σε ολευρωπαΐνη είναι μεγαλύτερη στους ανώριμους ελαιόκαρπους.

Η ολευρωπαΐνη αποσυντίθεται με επίδραση φωτός, οξέος, βάσης ή υψηλής θερμοκρασίας και τότε προκύπτει υδροξυτυροσόλη και ελενολικό οξύ (Jiao-Jiao Yuan et al., 2015). Οι ενώσεις που προκύπτουν κατά την υδρόλυση της ολευρωπαΐνης προσδίδουν στο ελαιόλαδο τις εκλεκτές οργανοληπτικές ιδιότητες και ιδιαίτερα την πικρή του γεύση. Επίσης οι πολυφαινόλες και ο ακόρεστος υδρογονάνθρακας σκουαλένιο παίζουν σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της οξειδωσης των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (τάγγισμα) (Vekiaris 2001; Amiot et al. 1989; Brenes et al. 1995).



Εικόνα 2. Υδρόλυση ολευρωπαΐνης.

Η ολευρωπαΐνη είναι, επίσης, ένα από τα κυρίαρχα σεκοϊριδοειδή που απαντάται στα φύλλα της ελιάς (Benavente-García et al., 2000; Silva et al., 2010; Sahin et al., 2012). Τα σεκοϊριδοειδή είναι μία οικογένεια συμπλέγματος φαινολών που υπάρχει στα ελαιοειδή φυτά, τα οποία δομικά μοιάζουν με τα πολύ γνωστά αντιγηραντικά μόρια, όπως αυτό της ρεσβερατρόλης.

Η ποσότητα των φαινολικών συστατικών της ελιάς ποικίλει και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης και η προσβολή του δάκου της ελιάς (Daane et al., 2010; Burrack et al., 2008). Η προσβολή της ελιάς από το δάκο έχει δυσάρεστες επιπτώσεις στην ποιότητα και τη φαινολική σύσταση της ελιάς. Επιπλέον, τα φαινολικά συστατικά της ελιάς μειώνονται όσο εξελίσσεται η ωρίμανσή της (Uceda & Hermoso, 1997), αν και υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα (Tamendjari et al., 2009). Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη τείνουν να αυξάνονται, ενώ αντίθετα η ολευρωπαΐνη μειώνεται με την ωρίμανση της ελιάς.

Όπως έχει ήδη προταθεί (Iannotta et al., 2001), συγκεκριμένες ποικιλίες ελιάς με αυξημένη συγκέντρωση ολευρωπαΐνης στο εσωτερικό του καρπού παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην προσβολή του δάκου της ελιάς. Ο μηχανισμός όμως που συμβαίνει αυτό, δεν είναι ακόμη σαφής. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση της ολευρωπαΐνης, και ακόμη στο ότι αυξημένη συγκέντρωση αυτής, είναι τοξική για το έντομο. Επίσης είναι γνωστό ότι τα φαινολικά συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του φυτού εναντίον παθογόνων οργανισμών και εντόμων (Haukioja et al., 1985; Hudgins et al., 2003). Έχει προταθεί ένας μηχανισμός δράσης της ολευρωπαΐνης και των μεταβολιτών της εναντίον των αυγών και της προνύμφης, με αποτέλεσμα να προκαλείται μείωση του ανερχόμενου πληθυσμού του δάκου της ελιάς.

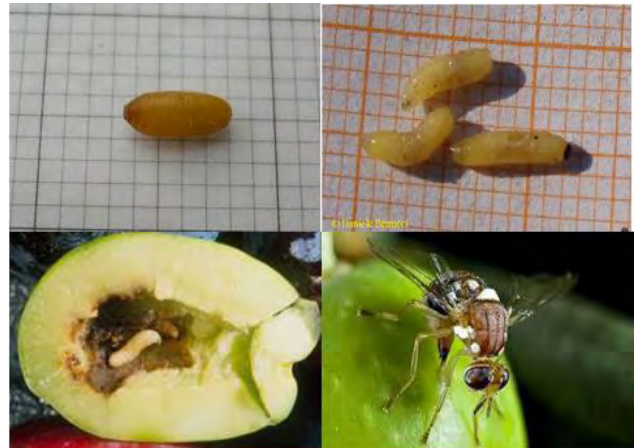
Η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης σχετίζεται με το μέγεθος της ελιάς και σύμφωνα με τους Amiot et al. (1986), όσο μικρότερο το μέγεθος του καρπού της ελιάς, τόσο αυξημένη η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης. Οι Iannotta et al. έκαναν γνωστό ότι η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης στον καρπό προσδιορίζεται γενετικά (2001) και δεν μεταβάλλεται μεταξύ προσβεβλημένων και μη προσβεβλημένων καρπών (2002).

1.2 Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων και είναι το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών παγκοσμίως (Daane et al., 2010). Είναι μία μύγα μήκους 5mm και χαρακτηριστικό γνώρισμά της είναι μια σκοτεινή κηλίδα στην άκρη κάθε πτέρυγας.

1.2.1 Κύκλος ζωής του εντόμου

Ο δάκος γεννά κυρίως τρεις φορές το χρόνο. Η πρώτη γενιά ενηλίκων εμφανίζεται την περίοδο Φεβρουαρίου-Μαρτίου. Οι μορφές που παρουσιάζει είναι: αυγό, προνύμφη (larva), νύμφη (pupa), ακμαίο. Κατά κανόνα, το θηλυκό έντομο εναποθέτει ένα αυγό σε κάθε καρπό. Η εκκολαπτόμενη προνύμφη μεγαλώνει φτιάχνοντας μία δίοδο στο μεσοκάρπιο, μέχρι να γίνει νύμφη. Το έντομο *B. oleae* χαρακτηρίζεται ως **μονοφάγο** έντομο, διότι η προνύμφη τρέφεται αποκλειστικά με το εσωτερικό του καρπού του ελαιόδεντρου, χωρίς να προσβάλλει άλλα φυτά. Η τροφή της προνύμφης προκαλεί μείωση της απόδοσης αρχικά μέσω της κατανάλωσης του εσωτερικού χυμού



Εικόνα 3. Πάνω αριστερά: νύμφη δάκου. Πάνω δεξιά: προνύμφη δάκου. Υπάρχουν τρία προνυμφικά στάδια και στο τελικό στάδιο, η προνύμφη έχει μήκος 7-8mm. Κάτω αριστερά: Προνύμφη που προσβάλλει τον ελαιόκαρπο. Κάτω δεξιά: Ενήλικο θηλυκό *B. oleae* που εναποθέτει τα αυγά του με τον ωοθέτη στον ελαιόκαρπο.

και στη συνέχεια με πρόωρη πτώση των καρπών. Επιπλέον, οι προσβεβλημένοι καρποί εμφανίζουν μία αλλοίωση στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά που τους καθιστά ακατάλληλους για απευθείας κατανάλωση (Koprivnjak et al. 2010).

1.2.2 Οικονομική σημασία του δάκου της ελιάς

Ο δάκος βρίσκεται εκεί όπου υπάρχουν άγριες και καλλιεργήσιμες ποικιλίες ελαιόδεντρων (Daane & Johnson, 2010). Οι πρώτες επιπτώσεις της προσβολής των ελαιοκαλλιεργειών παρατηρήθηκαν στις μεσογειακές κυρίως χώρες και ιδιαίτερα στην Ελλάδα, Ισπανία και Ιταλία, όπου και η παραγωγή ελαιολάδου και ελιάς είναι μεγαλύτερη.

	Ελλάδα	Ιταλία	Ισπανία
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο ως ποσοστό συνόλου	75-80%	40-45%	25-30%
Παραγωγή ελαιολάδου ως ποσοστό του ΑΕΠ	0,3%	0,1%	0,2%
Μερίδιο ελαιολάδου στην αξία της παραγωγής	11,0%	5,0%	6,0%
Ετήσια κατανάλωση ελαιολάδου ανά άτομο	16kg/άτομο	14kg/άτομο	12kg/άτομο
Κατανάλωση μη τυποποιημένου ελαιολάδου	75%	33%	50%
Εξαγωγές ελαιολάδου ως ποσοστό του συνόλου	31%	56%	51%

Εικόνα 4. Οικονομικά στοιχεία σχετικά με την παραγωγή ελαιολάδου. (International Olive Council 2016, World Olive Oil Figures & ΥΠΙΑΤ 2011. Παραγωγή ελιάς στην Ελλάδα)

Παρόλα αυτά, όμως, το μονοφάγο αυτό έντομο είναι πλέον γνωστό στις χώρες της Νότιας και Κεντρικής Αφρικής, της Μέσης Ανατολής, καθώς και της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής, για τις επιζήμιες επιπτώσεις του στην μείωση της απόδοσης της σοδειάς (Augustinos et al., 2002; Copeland et al., 2004; Nardi et al., 2003).



Εικόνα 5. Προσβεβλημένος ελαιόκαρπος

Σε περιοχές όπου έχει εδραιωθεί η παρουσία του εντόμου, σημειώνεται μείωση της αξίας του ελαιολάδου κατά 80%, ενώ για τις επιτραπέζιες ελιές η ζημία μπορεί να φτάσει έως και 100% (Neuenschwander & Michelakis, 1981, Neuenschwander et al., 1985, Tzanakakis, 2006). Μελέτες έχουν δείξει, ότι ο δάκος μπορεί να προκαλέσει 5% ζημία στην ολική παραγωγή ελαιολάδου, κάτι που μεταφράζεται σε 800 εκατομμύρια δολάρια ετησίως (Nardi et al., 2005).

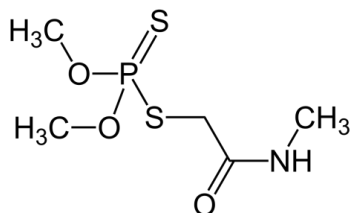
1.3 Καταπολέμηση του δάκου

1.3.1 Χρήση εντομοκτόνων

Η καταπολέμηση του δάκου σήμερα γίνεται με ψεκασμό με διάφορα οργανοφωσφορικά λιπάσματα (π.χ. Dimethoate), τα χαρακτηριστικά των οποίων είναι:

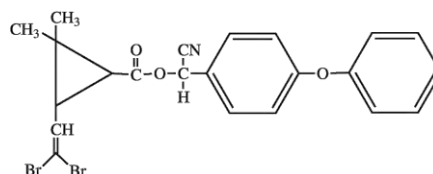
- Η παρουσία ατόμων άνθρακα και φωσφόρου
- Η χημική επιβάρυνση των οικοσυστημάτων και η επίδραση σε οργανισμούς μη-στόχους

- Η συχνά ευρεία δράση σε ωφέλιμα έντομα



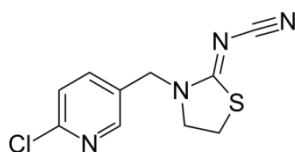
Εικόνα 6. Δομή Dimethoate

Επίσης για την καταπολέμηση του δάκου χρησιμοποιούνται και συνθετικά πυρεθροειδή (π.χ. Deltamethrin & Alpha-cypermethrin).



Εικόνα 7. Δομή Deltamethrin

Κάποιες φορές χρησιμοποιούνται και νεονικοτινοειδή (π.χ. Thiacloprid). Ο μηχανισμός δράσης τους είναι παρόμοιος με άλλα νεονικοτινοειδή και περιλαμβάνει προσβολή του νευρικού συστήματος του εντόμου με διέγερση νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης.



Εικόνα 8. Δομή Thiacloprid

Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς σήμερα γίνεται επίσης με το εντομοκτόνο Spinosad, το οποίο βασίζεται σε χημικές ενώσεις που βρίσκονται στο είδος του βακτηρίου *Saccharopolyspora spinosa*. Το εντομοκτόνο αυτό στοχεύει στο νευρικό σύστημα του εντόμου και λόγω της μεγάλης εξειδίκευσής του, χρησιμοποιείται σε μικρές ποσότητες, κάτι που καθιστά επιτρεπτή τη χρήση του στη βιολογική καλλιέργεια της ελιάς. Το μειονέκτημα του συγκεκριμένου εντομοκτόνου είναι το μεγάλο κόστος του.

1.3.2 Χρήση προσελκυστικών παγίδων

Η ανακάλυψη και εργαστηριακή σύνθεση των φερομονών (Παράγραφος 4.1) αναβάθμισε σημαντικά τις τεχνικές ελέγχου και καταπολέμησης του εντόμου, μέσω της χρήσης τους σε συνδυασμό με άλλα δολώματα. Η χρήση των φερομονών ή άλλων προσελκυστικών οσμών γίνεται κυρίως μέσω παγίδων, με σκοπό τη μαζική παγίδευση των εντόμων αυτών (mass trapping) ή τον έλεγχο των πληθυσμών (monitor). Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου καταπολέμησης είναι η μειωμένη αποτελεσματικότητά τους.

Οι σημαντικότεροι και πιο γνωστοί τύποι παγίδων αναπαριστώνται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 9. Οι τέσσερις κύριοι τύποι παγίδων του δάκου. Από αριστερά προς τα δεξιά: i) McPhail, ii) Yellow sticky panel, iii) OLIFE, iv) Attract and kill device.

1.3.3 Ολοκληρωμένη διαχείριση εντόμων

Ως ολοκληρωμένη διαχείριση των επιβλαβών εντόμων (Integrated Pest Management, IPM), ορίζεται η επιλογή, ενσωμάτωση και η εφαρμογή ελέγχου των επιβλαβών εντόμων με βάση την προβλεπόμενη οικονομία, οικολογικές και κοινωνικές συνέπειες, η οποία κάνει τη μέγιστη δυνατή χρήση φυσικών παραγόντων ελέγχου, συμπεριλαμβανομένων των καιρικών συνθηκών, των οργανισμών που προκαλούν ασθένειες, των θηρευτών και των παρασίτων (Bottrell, 1979).

Ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης φυτοπαρασίτων νοείται το σύστημα όπου τα κοινωνικοοικονομικά συναφή του συστήματος καλλιέργειας, το σχετιζόμενο περιβάλλον και ο εν δυνάμει πληθυσμός του εντόμου (στην περίπτωση αυτή), λαμβάνει υπόψη όλες τις τεχνικές εκείνες που είναι τόσο συμβατικές ώστε να διατηρείται ο πληθυσμός του εντόμου πιο κάτω από τα επίπεδα που μπορεί να προκαλεί οικονομική ζημία (Smith & Reynolds, 1966; Dent, 1991).

Για την ορθή εφαρμογή του ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης φυτοπαρασίτων θα πρέπει να εκτιμηθούν διάφορα **κριτήρια**:

- Αποτελεσματικότητα στον έλεγχο των επιβλαβών εντόμων
- Κόστος εφαρμογής
- Τοξικότητα στον άνθρωπο και στους οργανισμούς-μη στόχους
- Υπολειμματικότητα στο περιβάλλον

Οι τεχνικές καταπολέμησης του δάκου έως σήμερα, δεν είναι ικανοποιητικές, καθώς είτε είναι επικίνδυνες για τη δημόσια υγεία (χρήση οργανοφωσφορικών και πυρεθροειδών), είτε οδηγούν στην ανθεκτικότητα του εντόμου καθώς γίνεται αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων.

Επίσης, στην περίπτωση της μαζικής παγίδευσης και εξόντωσης δημιουργούνται οικολογικά προβλήματα κυρίως, καθώς δεν στοχεύουν συγκεκριμένα στο δάκο, αλλά γενικά στα έντομα. Αποτέλεσμα της μειωμένης αυτής εξειδίκευσης είναι η εξόντωση κοινωφελών εντόμων (π.χ. μέλισσες) ή εντόμων παρασιτοειδών που δρουν ως φυσικοί εχθροί του δάκου (π.χ. *Eurpelmusurozonus*) στο μικροπεριβάλλον της ελιάς.

1.3.4 Ειδοειδικότητα για τη βέλτιστη καταπολέμηση

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η ειδο-ειδικότητα είναι κεντρικός στόχος σε όλες τις προσπάθειες καταπολέμησης των εντόμων. Σήμερα, κάτι τέτοιο καθίσταται όλο και περισσότερο δυνατό μέσω εξελιγμένων μοριακών τεχνικών που στοχεύουν σε

συγκεκριμένα μόρια με κρίσιμο ρόλο για τις βασικές λειτουργίες του εντόμου. Ανάμεσα σε αυτές τις βασικές λειτουργίες συγκαταλέγονται η γεύση και η οσμή. Συνεπώς, η μελέτη των συστημάτων αυτών θα μπορούσε να συνεισφέρει προς την παραπάνω κατεύθυνση.

1.4 Χημειοαντίληψη εντόμων

Τα έντομα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα όσον αφορά τις αισθήσεις τους. Η αντίληψη των διάφορων και ποικίλων χημικών ουσιών που βρίσκονται στο περιβάλλον τους είναι ιδιαίτερα οξυμένη.

Η χημειοαντίληψη των εντόμων βασίζεται σε μία μεγάλη και ποικίλη οικογένεια υποδοχέων: των επτα-διαμεμβρανικών υποδοχέων (δηλαδή υποδοχείς με επτά διαμεμβρανικές επικράτειες). Αυτοί οι υποδοχείς αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά στη *Drosophila*, αλλά έχουν βρεθεί και σε άλλα έντομα, συμπεριλαμβανομένων των κουνουπιών και των σκώρων (Dahanukar et al., 2005).

1.4.1 Φερομόνες

Η καλύτερα μελετημένη χημειοαντίληψη των εντόμων είναι αυτή που αφορά την αναγνώριση και την εύρεση συντρόφου. Φερομόνη ονομάζεται η χημική ένωση που παράγει ένα άτομο ενός είδους με σκοπό να προκαλέσει μία συγκεκριμένη αντίδραση ή να μεταδώσει ένα συγκεκριμένο μήνυμα σε ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους (Karlson & Lüscher, 1959). Υπάρχουν φερομόνες κινδύνου, εντοπισμού τροφής, σεξουαλικές και πολλές άλλες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά και τη φυσιολογία των ατόμων συγκεκριμένων ειδών (Tristram D. Wyatt, 2003). Οι φερομονικές παγίδες χρησιμοποιούν φερομόνες θηλυκών ατόμων με σκοπό να προσελκύσουν τα αρσενικά άτομα και να τα παγιδεύσουν, έτσι ώστε η αναπαραγωγή να μην μπορεί να συνεχιστεί, με αποτέλεσμα να μειωθεί το είδος. Πολλοί υποδοχείς ανιχνεύουν γενικά οσμές ή γεύσεις, ενώ μερικοί ανιχνεύουν φερομόνες.

Το σύστημα των χημειοαισθητήρων των εντόμων μπορεί να εντοπίσει ένα μεγάλο εύρος από πτητικές και διαλυτές χημικές ενώσεις που είναι σημαντικές στην εύρεση και αξιολόγηση της ποιότητας της τροφής, στην αναγνώριση ζεύγους, στην εύρεση θέσης όπου θα εναποθέσει το έντομο τα αυγά του και σε άλλες σημαντικές δραστηριότητες, απαραίτητες για την επιβίωση και αναπαραγωγή του εντόμου.

1.4.2 Αισθητήρια (Sensilla)

Οι χημειοευαίσθητοι νευρώνες βρίσκονται σε ειδικές τρίχες που καλούνται αισθητήρια (*sensilla*). Τα οσφρητικά αισθητήρια βρίσκονται κυρίως στο κεφάλι, την κεραία και τα στοματικά μόρια, ενώ τα γευστικά αισθητήρια βρίσκονται σε διάφορα μέρη του σώματος, όπως τα εξωτερικά και εσωτερικά μέρη του στόματος, κάποια κενά των πτερών του εντόμου και τον ωοθέτη των θηλυκών εντόμων.

1.4.3 Δενδρίτες

Το νευρικό σύστημα των εντόμων είναι ένα δίκτυο από εξειδικευμένα κύτταρα που ονομάζονται νευρώνες και μέσω αυτών γίνεται η μετάδοση πληροφοριών μέσα στο σώμα. Κάθε νευρώνας αποτελείται από ένα σώμα νευρικών κυττάρων (πυρήνας) και από συνεχείς ίνες (δενδρίτες, άξονες) που είναι υπεύθυνες για την διάδοση του δυναμικού δράσης. Η μετάδοση του σήματος πραγματοποιείται πάντα προς μία κατεύθυνση:

- κινούμενη προς το σώμα των νευρικών κυττάρων κατά μήκος ενός δενδρίτη ή
- μακριά από το σώμα των νευρικών κυττάρων κατά μήκος ενός άξονα (Strausfeld, 1976).

1.4.4 Τρόπος με τον οποίο αντιλαμβάνονται τα έντομα τις χημικές ουσίες

Για να μπορεί ένα έντομο να αντιληφθεί και να ανταποκριθεί κατάλληλα στην παρουσία μιας χημικής ουσίας ή, συχνότερα, σε ένα μείγμα χημικών ουσιών, απαιτείται μεγάλος αριθμός επιδερμικών, κυτταρικών και μοριακών διεργασιών.

Τα έντομα, όπως όλα τα αρθρόποδα, καλύπτονται με ένα σύμπλοκο χιτίνης-πρωτεΐνης που ονομάζεται **επιδερμίδα**, το οποίο με τη σειρά του καλύπτεται με κερί για την αποφυγή της αποξήρανσης. Μία τροποποιημένη περιοχή της επιδερμίδας, που παρέχει έναν ή περισσότερους πόρους μέσω των οποίων μπορούν να εισέλθουν χημικές ουσίες, είναι κοινή σε όλα τα έντομα.

Σε διάφορα μέρη του σώματος του εντόμου, αλλά κυρίως στην κεραία, τα στοματικά μόρια, τα πόδια και τον ωσθέτη βρίσκονται χημικά αισθητήρια μόρια. Για τη διατήρηση του νερού και για τη διατήρηση της λειτουργίας των σημαντικών αισθητήριων κυττάρων, αυτοί οι πόροι δεν επιτρέπουν άμεση επαφή της αισθητήριας κυτταρικής μεμβράνης με τον αέρα. Υπάρχει πάντα μια διαδρομή νερού-πρωτεΐνης από τον πόρο στην κυτταρική μεμβράνη.

Η γεύση και η οσμή του εντόμου συνδέεται με ένα μονοπάτι από έξω προς τα αισθητήρια κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό. Τα εμπλεκόμενα κύτταρα περιλαμβάνουν τα ίδια τα αισθητήρια κύτταρα και είναι στενά συνδεδεμένα με βοηθητικά κύτταρα, ενώ τα μόρια περιλαμβάνουν μία ευρεία σειρά εξωκυτταρικών, ενδοκυτταρικών και μεμβρανικών δεσμευμένων πρωτεϊνών.

Οι διαδικασίες που εμπλέκονται στη γεύση και την οσμή περιλαμβάνουν τη δειγματοληψία του περιβάλλοντος, τη μεταφορά των μορίων διέγερσης στους υποδοχείς, τη λήψη, τη μεταγωγή, την κωδικοποίηση και τη μετάδοση στα υψηλότερα κέντρα του εγκεφάλου.

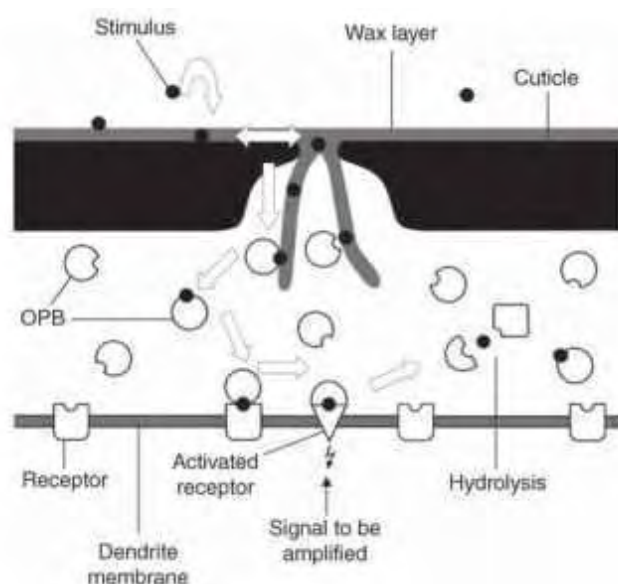
Οι κύριες διαφορές μεταξύ των οσφρητικών και γευστικών υποδοχέων εντοπίζονται στον τρόπο με τον οποίο εισέρχονται οι χημικές ουσίες στο σύστημα και με τις επιδερμικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν. Οι χημικές ουσίες εισέρχονται στο γευστικό αισθητήριο σύστημα μέσω ενός απλού πόρου στην άκρη. Αυτός ο πόρος περιέχει ένα σύμπλοκο ζάχαρης-πρωτεΐνης που προστατεύει τους δενδρίτες από την αποξήρανση και πιθανώς περιορίζει τους τύπους χημικών που μπορούν να περάσουν. Μόλις περάσει αυτό το φράγμα, η χημική ουσία εισέρχεται στο διάλυμα γύρω από τους δενδρίτες και ενδεχομένως μπορεί να αλληλεπιδράσει με το κύτταρο. Οι οσφρητικοί αισθητήρες έχουν συνήθως πολλούς πόρους, και είναι διαφορετικοί ως προς την προέλευση από αυτούς του γευστικού συστήματος (Anupama et al., 2005).

Τα συστατικά που αντιλαμβάνονται συνήθως τα ζώα με τη γεύση είναι περισσότερο υδατοδιαλυτά από αυτά που αντιλαμβάνονται με την όσφρηση. Οι αισθητήριοι δενδρίτες τόσο της γευστικής όσο και της οσφρητικής αίσθησης βρίσκονται σε υδατικό μέσο. Έτσι, το πρόβλημα της απόκτησης του ερεθίσματος στον υποδοχέα έχει λάβει πολύ μεγαλύτερη έκταση στην έρευνα για την οσμή. Στα έντομα, τα μόρια οσμής αρχίζουν να έρχονται σε επαφή με την επιδερμίδα και επειδή είναι κηρώδη, διαλύονται εύκολα. Από εδώ κινούνται σε δύο κατευθύνσεις και κάποια βρίσκουν το δρόμο τους στο άνοιγμα ενός καναλιού πόρων. Δεδομένου ότι ο πόρος του καναλιού περιέχει κερί, η διέλευση μέσω αυτού είναι πιθανόν εύκολη. Εντούτοις, προτού φθάσει στην επιφάνεια υποδοχής ενός δενδρίτη, το υδρόφοβο μόριο οσμής συναντά νερό.

Οι OBPs ανακαλύφθηκαν το 1981 στην κεραία του σκώρου *Antheraea polyphemus* (Vogt & Riddiford, 1981) και πλέον έχουν ταυτοποιηθεί και σε πολλά είδη εντόμων. Πρόσφατες εργασίες έχουν αποκαλύψει τουλάχιστον δύο τύπους πρωτεϊνών στους εξωκυττάριους χώρους. Ένας τύπος δεσμεύει συγκεκριμένα χημικές ουσίες που αποτελούν μέρος του μίγματος φερομόνης των σκωληκοειδών και επομένως ονομάζονται πρωτεΐνες δέσμησης φερομόνης (**pheromone binding proteins - PBP**). Ο άλλος τύπος δεσμεύει λιγότερο συγκεκριμένα μια ποικιλία μορίων μη-φερομόνης (π.χ. οσμές τροφίμων) και ονομάζονται γενικές πρωτεΐνες δέσμησης οσμών (**general odorant binding proteins - GOBP**).

Σε όλες σχεδόν τις μελέτες των αισθητήριων συστημάτων των ζώων, το ερέθισμα που ανιχνεύεται είναι σε διαφορετική ενεργητική μορφή από τη χημειοηλεκτρική μετάδοση που χρησιμοποιείται από το νευρικό σύστημα. Όταν η σύνδεση μεταξύ ερεθίσματος και του υποδοχέα έχει συμβεί, το γεγονός πρέπει να μεταδοθεί σε άλλα μέρη του αισθητήριου κυττάρου για να διασφαλιστεί ότι το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα μήνυμα δυναμικής δράσης που μεταδίδεται στον εγκέφαλο. Οι περισσότερες χημιο-μεταγωγές απαιτούν:

1. ένα περισσότερο ή λιγότερο εξειδικευμένο μόριο υποδοχέα (με τον τρόπο αυτό, μπορεί να σχηματισθεί το σύμπλοκο διεγέρτη - υποδοχέα),
2. ένα βήμα ενίσχυσης (που περιλαμβάνει μια σειρά δεσμευτών μεταξύ μεμβράνης και ενδοκυτταρικών μορίων)
3. ένα κανάλι ιόντων που ανιχνεύει την αύξηση του ασβεστίου και ανοίγει, επιτρέποντας την αποπόλωση, και
4. ένα σύστημα απενεργοποίησης σε μια σημαντική, στιγμιαία ανύψωση κάποιου χημικού στοιχείου (συχνά ασβεστίου), αποτελούμενο από περισσότερες



Εικόνα 10. Σχηματική περίληψη της κίνησης (βέλη) ενός μορίου οσμής (στερεοί κύκλοι) από την επιφάνεια ενός αισθητήρα προς τη δενδριτική μεμβράνη. Οι εξειδικευμένες πρωτεΐνες (διάφορα σχήματα) δρουν διαδοχικά ως φορείς, υποδοχείς και υδrolυτικοί παράγοντες για να είναι δυνατή η ακριβής ανίχνευση της οσμής

μοριακές αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε το σύστημα να μπορεί να ελεγχθεί με ακρίβεια.

1.5 Χημειούποδοχείς

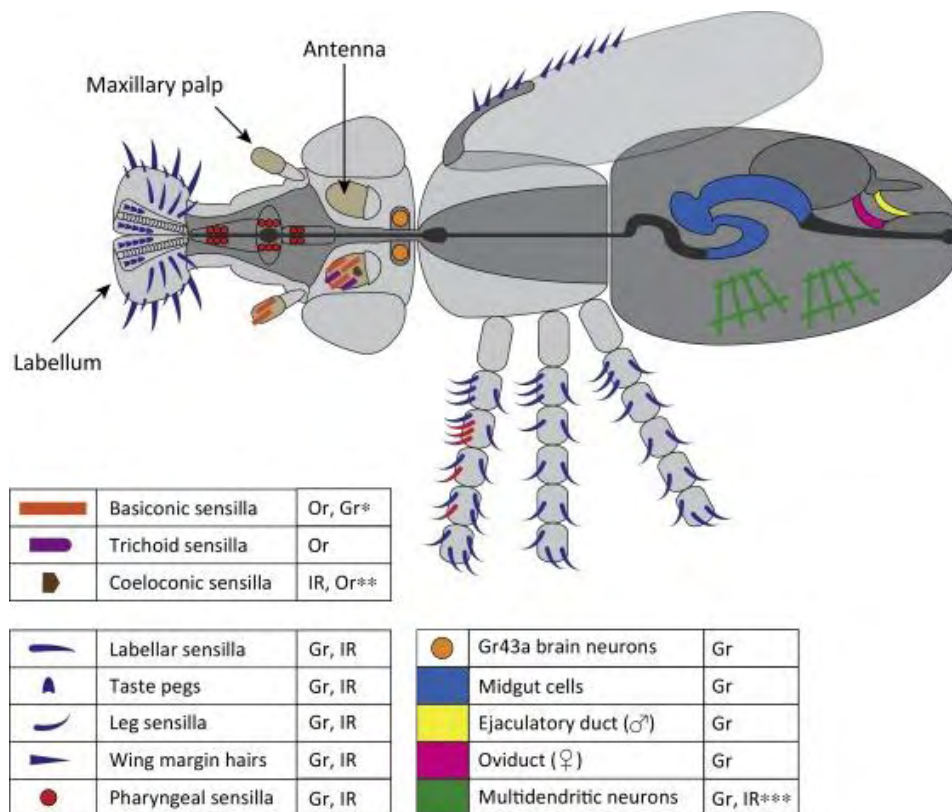
Η χημειοαντίληψη είναι απαραίτητη για την επιβίωση του εντόμου, γιατί με βάση αυτήν καθορίζεται η όλη συμπεριφορά του εντόμου: η εύρεση τροφής, το ζευγάρωμα, η ωοτοκία, ακόμη και η αποφυγή θηρευτών. Η προσαρμογή και η επιβίωση των εντόμων βασίζεται στους υποδοχείς εκείνους που ανταποκρίνονται σε χημικά ερεθίσματα και μπορούν να αντιληφθούν ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών χημικών ουσιών. Με βάση αυτούς τους υποδοχείς τα έντομα εντοπίζουν τους ξενιστές, το ζεύγος τους και το μέρος που θα εναποθέσουν τα αυγά τους (Agnihotri et al., 2016).

Υπάρχουν διάφορες οικογένειες χημειούποδοχέων, μεταξύ των οποίων οι κύριες είναι:

- Οσφρητικοί υποδοχείς (odor receptors – Or)
- Γευστικοί υποδοχείς (gustatory receptors – Gr)
- Ιονοτροπικοί υποδοχείς (ionotropic receptors – IR)

Η ανίχνευση των πτητικών ενώσεων γίνεται από οσφρητικούς υποδοχείς **ORs**, ενώ οι ενώσεις που βρίσκονται με τη μορφή διαλύματος εντοπίζονται με τους γευστικούς υποδοχείς **GRs** (Witcher et al., 2014). Έχειδειχθεί ότι οι οσφρητικοί υποδοχείς είναι υπεύθυνοι για τον προσανατολισμό του εντόμου ως προς τον ξενιστή του, ενώ οι γευστικοί υποδοχείς ευθύνονται για την επιλογή του ξενιστή (Hanson & Dethier, 1973; Boer & Hanson, 1987). Οι υποδοχείς **IRs** αποτελούνται από μία μεταβλητή, οσφρητικο-ειδική πρωτεΐνη IRX και μία πρωτεΐνη συνυποδοχέα IRcoY.

Οι κατηγορίες των υποδοχέων ORs, GRs και IRs παίζουν ρόλο στη σεξουαλική συμπεριφορά του εντόμου. Σύμφωνα με έρευνα των Joseph & Carlson (2015) που μελέτησαν τους χημειούποδοχείς της *Drosophila*, βρέθηκε ότι στον οργανισμό αυτό υπάρχουν γευστικοί υποδοχείς σε καθένα από τους λοβούς στην άκρη του χελαρίου (labellum) του εντόμου, στα πόδια, τον ωοθέτη, και ακόμη στην κοιλιά των θηλυκών εντόμων.

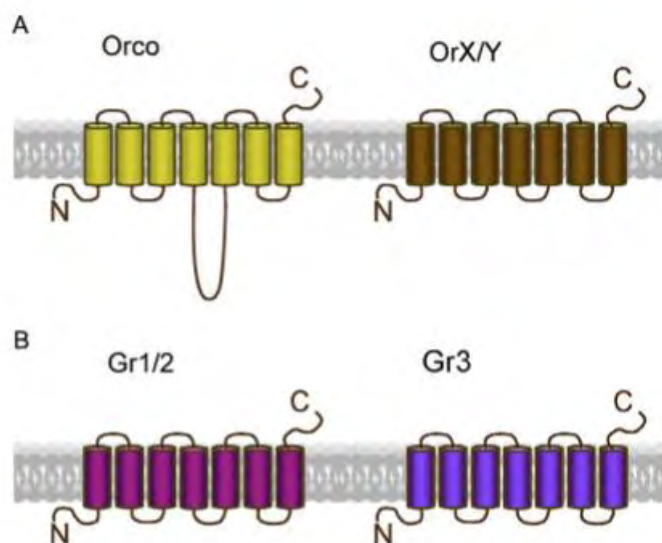


Trends in Genetics

Εικόνα 11. Έκφραση των τριών μεγαλύτερων οικογενειών χημειούποδοχέων στην *Drosophila*. Το ανοιχτό γκρι χρώμα δείχνει το εξωτερικό της μύγας και το σκούρο γκρι χρώμα δείχνει το εσωτερικό. Το μπλε χρώμα αναδεικνύει την κεραία και την άνω γνάθο, η οποία στεγάζει, κυρίως, οσφρητικούς νευρώνες. Οι αισθητήρες των ποδιών που υποδεικνύονται με κόκκινο χρώμα είναι αρρενο - ειδικοί. Η έκφραση γευστικού υποδοχέα (Gr) στο έντερο συμβαίνει σε εντεροενδοκρινικά κύτταρα σε αντίθεση με τους νευρώνες. Οι πολυδενδριτικοί νευρώνες είναι υποδερμικοί (Joseph & Carlson, 2015).

1.5.1 G Protein Coupled Receptors

Όλες οι πρωτεΐνες OR και GR ανήκουν στην οικογένεια των **επτα - διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (7-TM)**, αλλά σε αντίθεση με την κατηγορία των GPCR (G Protein Coupled Receptors), εμφανίζουν ανεστραμμένη τοπολογία στη μεμβράνη (Witcher et al., 2014). Συγκεκριμένα, οι GRs παρουσιάζουν μια ανεστραμμένη τοπολογία, με ένα ενδοκυτταρικό N τελικό άκρο και ένα εξωκυτταρικό C τελικό άκρο, όπως παρατηρήθηκε στο BmGr8 του *Bombyx mori* και στο HarmGr9 του *Helicoverpa armigera* (Zhang et al., 2011). Οι GPCR ονομάζονται επτα - διαμεμβρανικοί (7-TM) υποδοχείς, επειδή διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, παλινδρομικά επτά φορές. Όταν στις εξωκυτταρικές επικράτειες των GPCR δεσμεύονται προσδέτες, οι υποδοχείς μεταδίδουν σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω της ενεργοποίησης μίας πρωτεΐνης G (Watson et al., 2007). Ένας τρόπος βελτίωσης της ευαισθησίας της οσφρητικής αντίληψης είναι η ενίσχυση του αρχικού χημικού σήματος. Πολλά οσφρητικά συστήματα χρησιμοποιούν GPCRs, οι οποίοι παρέχουν διάφορα επίπεδα ενίσχυσης (Witcher et al., 2014). Με βάση μία εξελικτική ανάλυση των GPCRs και των ORs/GRs των εντόμων, αποκαλύφθηκε, ότι οι τελευταίες οικογένειες δεν σχετίζονται στενά με τους GPCRs υποδοχείς (Nordström et al., 2011).



Εικόνα 12. Δομή των αισθητήριων υποδοχέων στα έντομα. (Α) Οι οσφρητικοί υποδοχείς (ORs) είναι ετερομερή που αποτελούνται από έναν πανταχού παρών συν-υποδοχέα Orco και μία οσφρητικοειδική πρωτεΐνη Or, ORX για οσμές τροφών και ORY για φερομόνες. Αυτές οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μία 7-TM τοπολογία με ενδοκυτταρικό N-τελικό άκρο και εξωκυτταρικό C-τελικό άκρο, μία αντίστροφη κατεύθυνση σε σχέση με τις GPCRs. (Β) Γευστικοί υποδοχείς για την αντίληψη CO₂ σχηματίζουν ετεροδιμερή Gr1, Gr2 & Gr3 (Witcher et al, 2014).

1.5.2 Εξέλιξη οσφρητικών και γευστικών υποδοχέων

Οι Scott et al. (2001), είχαν προτείνει ότι στα αρθρόποδα, κάποιες πρωτεΐνες περιέχουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο στο καρβοξυλικό άκρο των ORs και των GRs και με αυτό τον τρόπο οι υποδοχείς αυτοί σχετίζονται. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί ότι οι ORs δεν υπάρχουν στην οικογένεια Crustaceae – η οποία περιλαμβάνει υδρόβιους, κυρίως θαλάσσιους, οργανισμούς – κάτι που δηλώνει ότι είναι εντομο-εξειδικευμένοι υποδοχείς, σε αντίθεση με τους GRs, που υπάρχουν και στην οικογένεια Crustaceae και στα έντομα (Peñalva-Arana et al., 2009). Έτσι, προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι ORs εξελικτικά δημιουργήθηκαν όταν τα προϊστορικά έντομα μετακινήθηκαν από τη θάλασσα στη γη.

Οι ORs μπορούν να εντοπίσουν συγκεκριμένες χημικές πτητικές ουσίες, αλλά και αερομεταφερόμενες οσμές (Missbach et al., 2014). Οι οσφρητικοί υποδοχείς των εντόμων είναι μία πολύ ποικιλόμορφη οικογένεια υποδοχέων, έχοντας πολύ μικρή συντήρηση μεταξύ των διαφορετικών ειδών αλλά και μέσα στο ίδιο είδος (Clyne et al., 1999; Vosshall et al., 1999; Robertson et al., 2003). Εξελικτικά, οι οσφρητικοί και γευστικοί υποδοχείς θεωρούνται από τα πλησιέστερα συγγενικά μόρια (Clyne et al., 2000; Scott et al., 2001).

1.5.3 Γευστικοί υποδοχείς

Οι γευστικοί υποδοχείς εκφράζονται σε χημειοευαίσθητους νευρώνες και μπορούν να εντοπίζουν ένα μεγάλο εύρος από διαφορετικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Η δέσμευση διαφόρων προσδετών σε GRs στην εξωκυτταρική περιοχή ενεργοποιεί μια αλληλουχία σηματοδότησης είτε με εξαρτώμενο είτε με ανεξάρτητο τρόπο από την

πρωτεΐνη G (Yao & Carlson, 2010; Zhang et al., 2011). Επομένως, η αποτελεσματική λειτουργία αυτής της αλληλουχίας σηματοδότησης εξαρτάται από τη διαφορική σύνδεση των προσδετών με την εξωκυτταρική περιοχή των GRs.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η αντίληψη των γεύσεων διατηρείται μέσω των GRs, οι οποίοι βοηθούν στο να αντιληφθούν διαφορετικές κύριες γεύσεις, όπως το πικρό, το γλυκό, το αλμυρό και το ξινό μέσω διαφορετικών οικογενειών μορίων. Τα έντομα έχουν πολλές παραλλαγές γευστικών υποδοχέων και επομένως στα έντομα διαφοροποιείται η αντίχνευση των γεύσεων (Agnihotri et al., 2016).

Οι φυλογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η οικογένεια γονιδίων GR είναι η αρχαία/γονική οικογένεια των χημειοϋποδοχέων στα έντομα από τα οποία έχουν εξελιχθεί τα οσφρητικά γονίδια (Hallem et al., 2006; Engsontia et al., 2014).

Οι αριθμοί των γονιδίων GR έχουν αυξηθεί σημαντικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ως αποτέλεσμα διπλασιασμού διαδοχικών γονιδίων.

1.5.3.1 Η συμπεριφορά του εντόμου ως αποτέλεσμα ενεργοποίησης γευστικών υποδοχέων

Η σύνδεση συγκεκριμένων προσδετών, όπως σάκχαρα ή αποτρεπτικά μόρια με τους GRs υποδοχείς θα οδηγήσουν στο να αποδεχθεί ή να απορρίψει το έντομο, αντιστοίχως, έναν συγκεκριμένο ξενιστή.

Η λειτουργία των GRs είναι ανεξάρτητη από τα ενδιάμεσα διαλυτά μόρια προσδετών που δεσμεύονται για την ενεργοποίησή τους (Sato et al., 2011). Αυτό επιτρέπει στους GRs να παράγουν ένα άμεσο σήμα κατά μήκος της μεμβράνης (Agnihotri et al., 2016).

Τα έντομα έχουν GR υποδοχείς στα πόδια και τα φτερά τους, τα οποία λειτουργούν στην επιλογή γονιμοποίησης και ωοτοκίας (Briscoe et al., 2013; Liman et al., 2014). Οι GRs που υπάρχουν στον θηλυκό ωοθήτη του *Spodoptera littoralis* ανταποκρίνονται σε δευτερογενείς μεταβολίτες όπως τα εκδυστεροειδή, και με τον τρόπο αυτό ξεκινά η ωοτοκία (Popescu et al., 2013). Στο είδος της πεταλούδας *Heliconius melpomene*, υπάρχουν σημαντικά μεγαλύτεροι αριθμοί GR που εκφράζονται στα πόδια των θηλυκών από αυτά των αρσενικών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ωοτοκία των θηλυκών οδηγεί την εξέλιξη των GRs (Zhou et al., 2012; Briscoe et al., 2013).

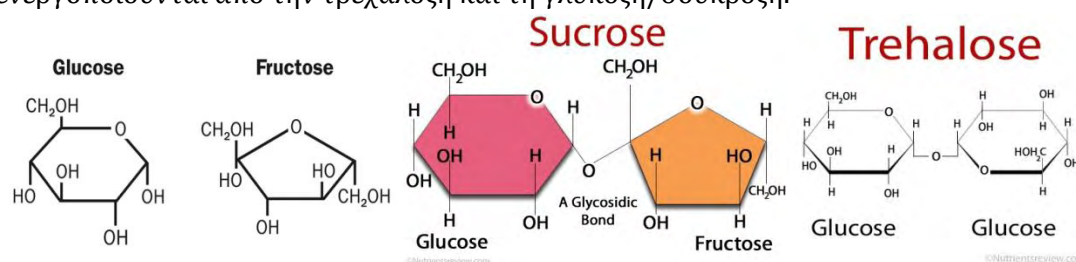
1.5.3.2 Ανίχνευση του CO₂

Μέσω των γευστικών υποδοχέων γίνεται και η αντίχνευση του CO₂, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά του εντόμου, γιατί συμβάλλει στον εντοπισμό του ξενιστή, τον έλεγχο της ποιότητας του φυτού και άλλα (Agnihotri et al., 2016). Έχει παρατηρηθεί ότι τα νέα φυτά παράγουν περισσότερο νέκταρ και άρα περισσότερη ποσότητα CO₂, και αυτό βοηθάει τα έντομα να διαλέξουν μεταξύ παλιού και νέου φυτού (Thom et al., 2004). Οι πρώτοι υποδοχείς που μελετήθηκαν στο έντομο *Drosophila melanogaster* είναι οι DmelGr21a και DmelGr63a (Xu et al., 2015). Ο DmGr21a μπορεί να ανταποκρίνεται στο CO₂ (Suh et al., 2004), σε συνδυασμό με τον DmGr63a (Jones et al., 2007; Kwon et al., 2007). Οι υποδοχείς DmGr21a και DmGr63a είναι ετερομερή του Gr1/2 και Gr3 (Jones et al., 2007; Kwon et al., 2007). Η λεπτομερής κατανόηση του ρόλου των GRs στην αντίχνευση του CO₂ ίσως αποδειχτεί σημαντική στην αξιολόγηση των πιθανών επιπτώσεων της προβλεπόμενης κλιματικής αλλαγής, καθώς τα επίπεδα

του CO₂ στην ατμόσφαιρα αυξάνονται και υπάρχει ανησυχία για τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει αυτό στα έντομα (Strange & Wong, 1993; Strange, 1997; Percy et al., 2002).

1.5.3.3 Απόκριση στη γλυκιά γεύση

Η αντίληψη του γλυκού βοηθά το έντομο να εντοπίσει την παρουσία σακχάρων και τροφής, και αυτό οδηγεί σε αυξημένη τροφική ανταπόκριση στα έντομα. Οι υποψήφιοι GRs που απαιτούνται για την ανίχνευση της γλυκιάς γεύσης, ανταποκρίνονται σε ένα μεγάλο εύρος σακχάρων (Agnihotri et al., 2016). Έχει παρατηρηθεί ότι περισσότεροι του ενός είδους GR μπορούν να εντοπίσουν ένα μόνο σάκχαρο και ότι, αντίστροφα, διαφορετικοί τύποι σακχάρων μπορούν να ενεργοποιήσουν έναν μόνο GR (Dahanukar et al., 2007; Slone et al., 2007; Jiao et al., 2008; Wanner et al., 2008; Jiang et al., 2015). Ο GR43a είναι εξειδικευμένος στην ανίχνευση της D-φρουκτόζης *in vivo* και επίσης λειτουργεί στον εγκέφαλο για να ανιχνεύσει το επίπεδο φρουκτόζης στο αίμα, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει τη συμπεριφορά διατροφής του εντόμου (Miyamoto et al., 2012). Οι Freeman et al. (2014) έδειξαν ότι ο GR43a μπορεί επίσης να ανταποκριθεί σε ένα εύρος και άλλων σακχάρων εκτός φρουκτόζης. Περισσότερο όμως στα άλλα σάκχαρα εκτός της φρουκτόζης ανταποκρίνονται οι GR5a και GR64a, οι οποίοι ενεργοποιούνται από την τρεχαλόζη και τη γλυκόζη/σουκρόζη.



Εικόνα 13. Δομές σακχάρων που ανιχνεύονται μέσω γευστικών υποδοχέων των εντόμων.

1.5.3.4 Απόκριση στη πικρή γεύση

Συνήθως η απόκριση στην πικρή γεύση στα έντομα είναι σημάδι τοξικών ουσιών και σηματοδοτούν την ύπαρξη ενδεχόμενου κινδύνου. Η αναγνώριση των πικρών ενώσεων (τοξικοί μεταβολίτες των φυτών) είναι πιο κρίσιμη και πιο εξειδικευμένη από τα σάκχαρα, λόγω της τοξικότητας και της ποικιλομορφίας τους (Agnihotri et al., 2016). Επίσης, αυτές οι ενώσεις θα πρέπει να εντοπίζονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, με σκοπό να αποφευχθεί πιθανό διατροφικό λάθος για το έντομο (Agnihotri et al., 2016). Τα έντομα έχουν κύτταρα γεύσης που ανταποκρίνονται επιλεκτικά σε επιβλαβείς ή τοξικές φυτικές ενώσεις (Ma, 1972; Blom, 1978; Dethier, 1980; Frazier, 1986; Charman et al., 1991; Van Loon & Schoonhoven, 1999). Τα αποτρεπτικά αυτά GRNs έχουν διακριτά ή αλληλοεπικαλυπτόμενα μοριακά δεκτικά εύρη. Μπορούν να ανταποκρίνονται σε διαφορετικούς δομικά δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης διαφορετικών μονοπατιών σηματοδότησης, το καθένα με διαφορετικά πρότυπα.

Η διαφοροποίηση στην προσαρμογή των εντόμων προκαλείται από το ότι τα μόρια μπορεί να είναι απλώς δυσάρεστα ή να είναι δυσάρεστα, πικρά και τοξικά. Τα έντομα μπορούν να προσαρμοστούν σε αποτρεπτικά μέσα με απευαισθητοποίηση του

περιφερειακού ή κεντρικού γευστικού συστήματος (Agnihotri et al., 2016). Ο μηχανισμός απευαισθητοποίησης μπορεί να συμβεί μέσω οποιουδήποτε από τα δύο μονοπάτια: φωσφορυλίωση ή χαμηλότερη έκφραση GRs (Dawson et al., 1993, Glendinning et al., 2001).

Η αισθητηριακή προσαρμογή στην αποσπασματική απόκριση που δημιουργείται από μία πικρή ένωση δεν δείχνει διασταυρούμενη προσαρμογή στην αποσπασματική απόκριση που προκαλείται από άλλες πικρές ενώσεις (Agnihotri et al., 2016). Αυτό υποδηλώνει σαφώς ότι, μολονότι ένα μόνο GRN είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία απόκρισης σε περισσότερες από μία πικρές ενώσεις, τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος για την κάθε ένωση είναι διαφορετικά (Glendinning & Hills, 1997).

1.6 Ωοτοκία

Η γευστική λειτουργία της επικοινωνίας του ωοθέτη με χημειοϋποδοχείς έχει επιβεβαιωθεί με ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές σε Diptera και Lepidoptera (Rice 1976; Hood Henderson 1982; Waladde 1983; Girolami et al. 1986; Crnjar et al. 1989; Maher et al. 2006). Είναι ήδη γνωστό ότι οι γευστικοί αισθητήριοι υποδοχείς ανταποκρίνονται σε χημικές ουσίες όπως τα άλατα, το νερό και τα αμινοξέα (Rice, 1976; Chadha and Roome, 1980). Έτσι, μπορεί να συσχετιστεί το γεγονός ότι η ωοτοκία συμβαίνει σε φρέσκους και μη ώριμους καρπούς (Faucheux, 2012).

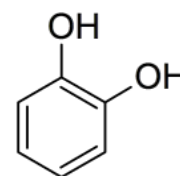
Πολλοί ερευνητές μελέτησαν τη σχέση των γευστικών υποδοχέων σχετικά με τον ρόλο που παίζουν στην ωοτοκία. Στα υμενόπτερα παρασιτοειδή, για παράδειγμα, η παρουσία γευστικού αισθητήρα στο μέρος του ωοθέτη που διεισδύει στον ξενιστή επιτρέπει την ανίχνευση διαλυτών χημικών ουσιών στην αιμολέμφο του ασπόνδυλου ξενιστή (Brown and Anderson 1998; Le Ralec and Wajnberg 1990; Le Ralec et al. 1996; La Rocca et al. 2007; Van Lenteren et al. 2007).

Είναι γνωστό ότι κάποια είδη εκφράζουν προτιμήσεις κατά την επιλογή φυτικών ειδών ή μέρους φυτών για ωοτοκία (Robert 1959; Martens 1992, 1993, 1994, Grunert, 1995; Wildermuth 1993), υποδηλώνοντας έτσι την ικανότητα να αντιλαμβάνονται χημικά ερεθίσματα.

1.6.1 Ωοτοκία στο έντομο *B. oleae*

Σύμφωνα με έρευνα των Solinas et al (2001), όπου μελετήθηκε η σχέση του *sensilla* "C" –γευστικού υποδοχέα – και της ολεωρωπαΐνης στο *B. oleae*, παρατηρήθηκε η παρουσία τεσσάρων χημειοαισθητήρων νευρώνων, δύο εκ των οποίων ανταποκρίνονται στις ενώσεις του φυτού – ξενιστή. Συγκεκριμένα, το ένα κύτταρο παρουσίασε ευαισθησία στην ολεωρωπαΐνη και στο προϊόν αποικοδόμησης αυτής, την πυροκατεχίνη, ενώ το άλλο κύτταρο παρουσίασε ευαισθησία μόνο στο τελευταίο προϊόν. Επιπλέον, στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε ότι η ωογένεση του δάκου της ελιάς προκαλείται όχι μόνο χάρη στην παρουσία της ολεωρωπαΐνης στον καρπό αλλά και στο σφαιρικό σχήμα του καρπού που τον καθιστά κατάλληλο για ωοτοκία.

Έτσι οι βιολογικές δοκιμασίες συμπεριφοράς που έγιναν από τους Solinas et al. (2001), επιβεβαιώνουν την ωογένεση και τη διέγερση της ωοτοκίας στο θηλυκό *B. oleae* μέσω επαφής με ουσίες φυτικών ξενιστών όπως η ολευρωπαΐνη και άλλα προϊόντα (π.χ. πυροκατεχίνη).



Εικόνα 14. Δομή πυροκατεχίνης

Έχει αποδειχθεί (Cirio, 1971), ότι ο χυμός που απελευθερώνεται από τον ωοθέτη του εντόμου *B. oleae* όταν αυτός διεισδύει στον καρπό, συνήθως εξαπλώνεται στην επιφάνεια της ελιάς και έτσι, εμποδίζει περαιτέρω ωοτοκία στον ίδιο καρπό. Η αποτρεπτική δραστηριότητα στην ωοτοκία σχετίζεται με το ελαιώδες κλάσμα του χυμού της ελιάς, αλλά και με τις υδατοδιαλυτές φαινόλες (Girolami et al., 1981). Οι μη πτητικές ενώσεις ελιάς, όπως η γλυκοζιτική ολευρωπαΐνη, διεγείρουν την ωογένεση της μύγας, κατά πάσα πιθανότητα με επαφή με τους ταρσούς (Girolami et al., 1989, Girolami & Coututti 1991, 1994). Ταρσός είναι το περιφερικό μέρος του ποδιού ενός εντόμου, που συνήθως υποδιαιρείται στον ενήλικα σε δύο έως πέντε τμήματα.

Είναι πιθανόν ότι μεσολαβούν αλληλεπιδράσεις εντόμων – φυτών, μέσω των χημειοαισθητήρων που βρίσκονται στον ταρσό της μύγας, όπως έχει αποδειχθεί σε άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae (Crnjar & Prokopy, 1982; Stadler et al., 1994). Είναι χαρακτηριστικό ότι τα θηλυκά *B. oleae* τρίβουν τους ταρσούς τους και προχωρούν σε εξέταση και ανίχνευση του καρπού και η διαδικασία αυτή συχνά ολοκληρώνεται με ωοτοκία.

Η ολευρωπαΐνη είναι ένας γλυκοζίτης που έχει ένα σχετικά μεγάλο, μη πτητικό και υδατοδιαλυτό μόριο, επομένως, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως η ουσία που ρυθμίζει άμεσα την αναπαραγωγική συμπεριφορά στο *B. oleae*. Ο γλυκοζίτης είναι πιθανώς ο χημικός πρόδρομος μιας ή περισσότερων άγνωστων λιποδιαλυτών ενώσεων που μπορούν να φτάσουν στην επιφάνεια του καρπού της ελιάς και να παραμείνουν στους επιφανειακούς κηρούς.

Η αδράνεια του ελενικού οξέος τόσο στην ωογένεση όσο και στην ωοτοκία και η μέτρια δραστηριότητα της πυροκατεχίνης στην ωογένεση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι χημικές ενώσεις που προέρχονται από τη διάσπαση της ολευρωπαΐνης και εμπλέκονται στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του *B. oleae* θα πρέπει να είναι φαινολικές ενώσεις.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η απόκριση επιλεγμένων γονιδίων GRs του δάκου μετά από έκθεση του εντόμου σε *ολευρωπαΐνη*. Για το σκοπό αυτό, απομονώθηκαν τα στοματικά μόρια, ο ωοθέτης και ο μεσονότος εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων σε ολευρωπαΐνη θηλυκών εντόμων. Στον ωοθέτη είναι κρίσιμα τα συμπεράσματα που θα ληφθούν διότι είναι το όργανο που καθορίζει το πού και γιατί ο δάκος θα εναποθέσει τα αυγά του και επομένως η κατανόηση της έκφρασης των γονιδίων σε αυτό το όργανο θα παρέχει σημαντικές πληροφορίες στη στρατηγική καταπολέμησης εξάπλωσης του πληθυσμού του εντόμου σε καλλιέργειες ελιάς.

3 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

3.1.1.1 Εκτροφή δάκου

Η εκτροφή του δάκου έγινε στο εργαστήριο Εντομολογίας του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας χρησιμοποιώντας άγριο πληθυσμό δάκου. Ηθολογικά, δεν απαιτείται ειδική άδεια συλλογής του δάκου, διότι είναι το κυρίαρχο έντομο των ελαιοκαλλιεργειών στην περιοχή και δεν αποτελεί είδος υπό εξαφάνιση ή προστατευόμενο είδος.

Τα πειράματα διεξήχθησαν υπό σταθερές συνθήκες [θερμοκρασία: $\pm 24^{\circ}\text{C}$, υγρασία: 60-65%, L14:D10 (όπου L: light, φως & D: dark, σκοτάδι)] το χρονικό διάστημα Δεκέμβριο έως Φεβρουάριο 2016 – 2017. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ελιές βιολογικού τύπου, στις οποίες δεν είχε προστεθεί καμία επιπρόσθετη ουσία και οι οποίες διατηρήθηκαν σε χώρο αποθήκευσης για αρκετούς μήνες. Οι ελιές αυτές συλλέχθηκαν στα Λεχώνια Μαγνησίας το διάστημα Σεπτέμβριος – Οκτώβριος 2016.

Τα έντομα αναθράφηκαν από 1 έως 3 γενιές. Όλα τα ενήλικα έντομα διατηρήθηκαν σε ξύλινα κλουβιά ($30 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$) τα οποία ήταν αεριζόμενα από τις τρεις πλευρές. Τα έντομα είχαν ελεύθερη πρόσβαση στο νερό και στη τροφή [μίγμα υδρολυμένης μαγιάς – πρωτεΐνης (MO Biomediacals LLC., France) και ζάχαρης σε αναλογία 1:4]. Στα θηλυκά άτομα *B. oleae* δόθηκαν ελιές προς ωτοκία. Επομένως, η ανάπτυξη της προνύμφης (larve) έλαβε χώρα στην ελιά και η νύμφη που προέκυψε διατηρήθηκε στις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω.



Εικόνα 15. Εκτροφή άγριου πληθυσμού ενήλικων θηλυκών ατόμων *B. oleae* στο Τμήμα Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.1.1.2 Εφαρμογή ολευρωπαϊνης

Η ολευρωπαϊνη απομονώθηκε από το Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο (Τμήμα Φαρμακευτικής) και χορηγήθηκε με τη μορφή σκόνης. Επιλέξαμε να δουλέψουμε σε ένα εύρος συγκέντρωσης ολευρωπαϊνης 5-10 ng/μL. Σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία, το LC50 για τον δάκο της ελιάς δεν είναι γνωστό [Lethal Concentration: είναι η συγκέντρωση μιας ξενοβιοτικής ουσίας στον περιβάλλοντα αέρα ή νερό που περιβάλλει τους οργανισμούς ικανή να προκαλέσει το θάνατο του 50% του πληθυσμού στην ολευρωπαϊνη]. Έτσι υποθέτοντας LC50 ίσο με **100μM** σημαίνει 54,05 μg/ml ή **54,05 ng/μl** (Mroleuropein=540,52). Τελικά με διαδοχικές αραιώσεις καταλήξαμε σε **Coleuropein=7,7ng/μL**, με τον παρακάτω τρόπο:

- Stock (**Δ/μα 1**): 100mg **oleuropein** + 650μL H₂O + 650 μL **ethanol** [100mg σε 1300μL ή 1 mg σε 13μL = 0,077 mg/μL ή 77 μg/μL]
- Δ/μα (**2**): 5μL του (**1**) + 495μL **acetone** [0,77 μg/μL ή 770 ng/μL]
- Δ/μα (**3**): 5μL του (**2**) + 495μL **acetone** [7,7 ng/μL]

Τα διαλύματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 5°C.

Μία σταγόνα του διαλύματος (**3**) (1 σταγόνα = 1μL) εναποτέθηκε στο έντομο *Bactrocera oleae* σε ένα από τα ακόλουθα σημεία για κάθε ανεξάρτητο χειρισμό: ωοθέτη ή στοματικά μόρια ή μεσονότο.

3.1.1.3 Απομόνωση ιστών από ενήλικα θηλυκά *B. oleae*

Πραγματοποιήθηκε αναισθητοποίηση θηλυκών ατόμων με χρήση CO₂, και τοποθέτηση αυτών στους -19°C, για 2 λεπτά (minutes). Έπειτα έγινε εφαρμογή διαλύματος ολευρωπαϊνης ή ακετόνης (μάρτυρες) στις περιοχές του ωοθέτη, των στοματικών μορίων και του μεσονότου, αναμονή 15 λεπτών με σκοπό την έκφραση των γονιδίων και αναισθητοποίηση εκ νέου στους -19°C, για 2 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των ωοθετών, στοματικών μορίων και μεσονότων των θηλυκών εντόμων *B. oleae* με χρήση κατάλληλου νυστεριού. Οι απομονωμένοι ιστοί διατηρήθηκαν σε διάλυμα TRI reagent (MRC).

3.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση RNA των ιστών του ωοθέτη, των στοματικών μορίων και του μεσονότου που διατηρήθηκαν σε διάλυμα TRI reagent (MRC), με σκοπό την περαιτέρω σύνθεση cDNA.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

Ομογενοποίηση:

- ομογενοποίηση των δειγμάτων των ιστών με TRI (1ml/50-100mg του ιστού) χρησιμοποιώντας έμβολα ομογενοποίησης

Διαχωρισμός φάσεων:

- τα ομογενοποιημένα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά για να επιτευχθεί η πλήρης αποσύνθεση των συμπλεγμάτων νουκλεοπρωτεϊνών
- Προσθήκη σε κάθε tube 0,1 ml BCP ή 0,2 ml χλωροφορμίου ανά 1 ml TRI
- Κάλυψη των δειγμάτων
- Έντονη ανακίνηση για 15 δευτερόλεπτα
- Αποθήκευση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 2-15 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C

Κατακρήμνιση RNA:

- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο tube
- Χρήση 0,5ml ισοπροπανόλης για κάθε 1ml αντιδραστηρίου TRI που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική ομογενοποίηση
- Επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5-10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 8 λεπτά στους 4°C - 25°C

Έκπλυση RNA:

- Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη αιθανόλης 75%
- Φυγοκέντρηση στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4°C - 25°C
- Προσθήκη σε κάθε tube 1 ml αιθανόλης 75 % για κάθε 1 ml αντιδραστηρίου TRI που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση

Διαλυτοποίηση RNA:

- Αφαίρεση της αιθανόλης (υπερκείμενο) και στέγνωμα του ιζήματος σε στείρες συνθήκες για 3 - 5 λεπτά
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε 8μl νερό

3.3 Κατεργασία με DNase

Τα δείγματα είναι τοποθετημένα σε PCR tubes (ένα σε κάθε tube). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10.0μl σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Ambion®).

Πίνακας 1. Πρωτόκολλο επεξεργασίας με DNase

Αντιδραστήριο	(μl)
RNA	8.0
Buffer	1.0
DNase	0.2
H ₂ O	0.8
Τελικός όγκος	10.0

Έπειτα, η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 25 λεπτά. Μετά το πέρας των 25 λεπτών προστίθεται 1μl inactivation buffer με σκοπό την απενεργοποίηση της DNase και η κάθε αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 10.000g για 2 λεπτά, και ~8μl του υπερκλειμένου μεταφέρονται σε νέο tube.

3.4 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση cDNA είναι απαραίτητη για το τρέξιμο των δειγμάτων σε Real Time PCR. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αντίδραση για κάθε δείγμα σε τελικό όγκο 20μl, το πρωτόκολλο της οποίας φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Ambion®).

Αντιδραστήριο	(μl)
RNA	8.5
Random primers	1.0
dNTPs (40mM)	0.25
H ₂ O	2.25
Buffer	4.0
Inhibitor	1.0
DDT	2.0
Reverse transcriptase	1.0
Τελικός όγκος	20.0

Τα στάδια της αντίδρασης είναι τα εξής:

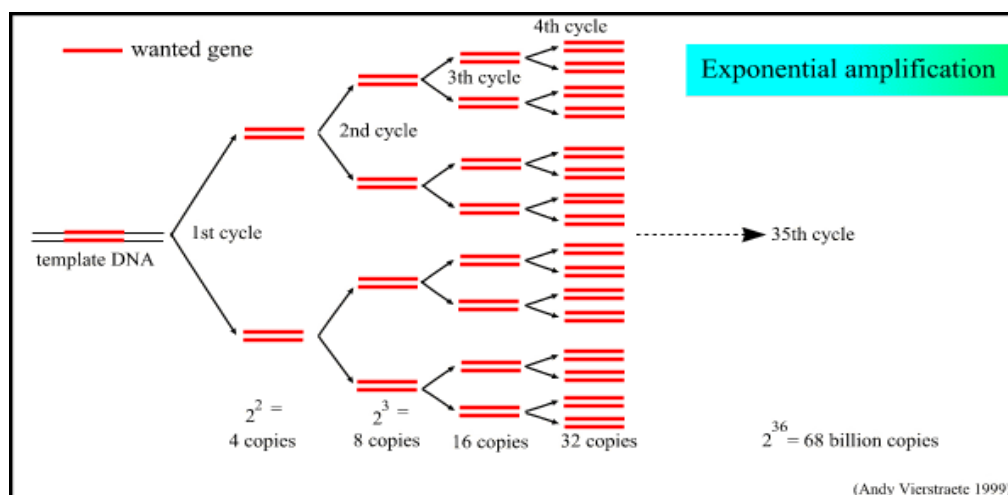
1. Προσθήκη των 4 συστατικών (RNA, Random primers, dNTPs, H₂O)
2. Θέρμανση του μίγματος στους 65°C για 5 λεπτά
3. Ταχύ πάγωμα στον πάγο και σύντομη φυγοκέντρηση.
4. Προσθήκη των υπόλοιπων 3 συστατικών (Buffer, Inhibitor, DDT) και ήπια ανάδευση
5. Επώαση στους 37°C για 2 λεπτά
6. Προσθήκη της Reverse Transcriptase
7. Επώαση στους 37°C για 50 λεπτά
8. Απενεργοποίηση στους 70°C για 15 λεπτά

3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον βιοχημικό Kary Mullis, που εργαζόταν σε μια εταιρεία

βιοτεχνολογίας της Καλιφόρνιας. Για την ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp) *in vitro*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα την λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Ανάλογα με το μέγεθος του επιθυμητού προϊόντος ρυθμίζεται και ο αριθμός των κύκλων, λαμβάνοντας υπόψιν ότι συνήθως μετά τους 30 κύκλους η μέθοδος εμφανίζει συχνά λάθη. Ο υπολογισμός των τελικών αντιγράφων της αλληλουχίας προκύπτει ως 2^n αντίγραφα του κάθε αρχικού μορίου DNA, όπου n οι κύκλοι της PCR.



Εικόνα 16. Η εκθετική ενίσχυση του γονιδίου σε PCR (Vierstraete, 1999)

Χρησιμοποιείται στη βασική έρευνα για την ενίσχυση και απομόνωση αλληλουχιών από ελάχιστες ποσότητες DNA (ακόμη και από ένα κύτταρο), όπως επίσης και στην ανάλυση ποικιλομορφίας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και στην *in vitro* μεταλλαξιγένεση.

Στάδια της PCR

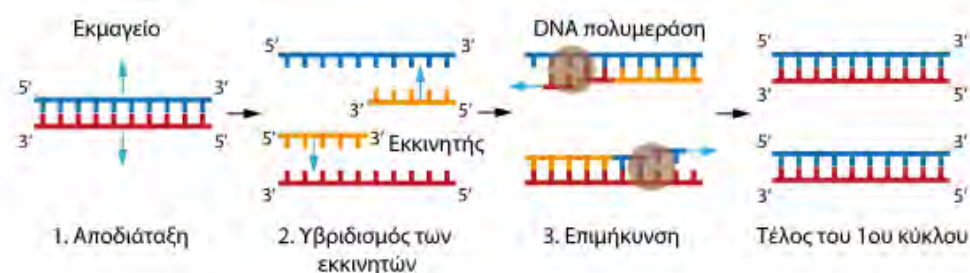
1. **Αποδιάταξη:** Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (γίνεται ρήξη των δεσμών υδρογόνου που συνδέουν τις συμπληρωματικές βάσεις) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C. Το DNA είναι διαχωρισμένο για παρατεταμένο χρόνο, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί, ότι το μητρικό DNA και οι εκκινητές έχουν διαχωριστεί πλήρως. Ο χρόνος διάρκειας του κύκλου αυτού είναι περίπου 30 sec έως 1 min.
2. **Υβριδισμός εκκινητών:** Με μείωση της θερμοκρασίας οι εκκινητές (primers) υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA. Η

θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m), οι δύο αυτές παράμετροι υπολογίζονται σύμφωνα με τούς παρακάτω τύπους:

$$T_m = 4 * (\text{αριθμός βάσεων } G+C) + (\text{αριθμός βάσεων } A+T)$$

$$T_a = T_m - 5 \text{ (Thein \& Wallace, 1986)}$$

3. **Επιμήκυνση:** Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C , τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό.



Εικόνα 17. Σύνοψη των σταδίων της PCR

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία ($^\circ \text{C}$)	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95	2-5 min
2. Αποδιάταξη	95	30-45 sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	55-65	30-45 sec
4. Επιμήκυνση (1 kb/min)	72	45 sec
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 30-35 φορές		
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 min

Εικόνα 18. Στάδια μίας τυπικής αντίδρασης PCR

Υλικά

- DNA
- Εκκινητές (Forward & Reverse)
- dNTPs
- DNA Taq πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (buffer)
- MgCl_2

3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time Polymerase chain reaction, RT-PCR)

Κατά τη συμβατική PCR, το ενισχυμένο προϊόν εντοπίζεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης αφότου έχει ολοκληρωθεί η αντίδραση. Στη real-time PCR, αντίθετα, το ενισχυμένο προϊόν μπορεί να εντοπισθεί και να μετρηθεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο. Η real-time PCR βασίζεται στην επαναστατική μεθοδολογία της ποσοτικής PCR και πρωτοεμφανίστηκε το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του.

Ο εντοπισμός των προϊόντων της PCR, κατέστη δυνατός με τη χρήση ενός φθορίζοντος μορίου του οποίου το φθορίζον σήμα είναι ανάλογο της ποσότητας DNA στο δείγμα. Οι φθορίζουσες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν χρωστικές που δεσμεύονται σε δίκλωνο DNA και ειδικές αλληλουχίες εκκινητών (primers) ή ανιχνευτών (probes) επισημασμένες με φθορισμό. Μία τέτοια φθορίζουσα χρωστική είναι η **SYBR Green**. Μειονέκτημα κατά τη χρήση της χρωστικής αυτής ως σύστημα ανίχνευσης είναι πως μπορεί να ενσωματώνεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο, εκτός του μορίου-στόχου, συμπεριλαμβάνοντας και διμερή των εκκινητών ή ενισχυμένα μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης και να οδηγεί τελικά σε αύξηση του συνολικού φθορισμού. Ειδικοί θερμοκυκλοποιητές εξοπλισμένοι με μονάδες φθορισμού χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση φθορισμού του προϊόντος ενίσχυσης. Ο μετρούμενος φθορισμός αντανακλά την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο.

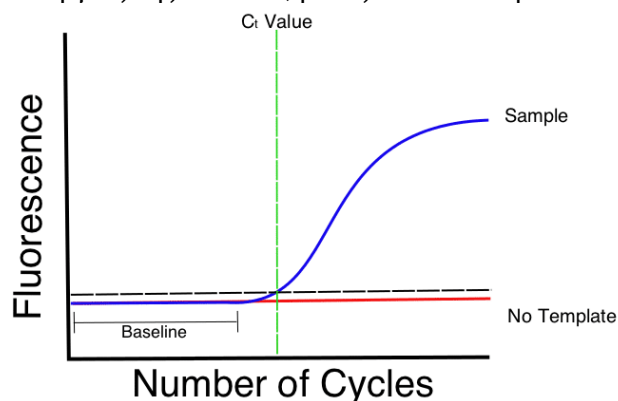


Εικόνα 19. Θερμοκυκλοποιητής Bio Rad που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρούσα πειραματική διαδικασία.

Το βασικό πλεονέκτημα της RT-PCR έναντι της συμβατικής είναι πως επιτρέπει να καθοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων της εκκίνησης της αντίδρασης με ακρίβεια και υψηλή ευαισθησία σε ένα ευρύ δυναμικό εύρος. Τα αποτελέσματα της RT-PCR μπορούν να είναι είτε ποιοτικά (παρουσία ή απουσία μίας αλληλουχίας) ή ποσοτικά (αριθμός αντιγράφων του DNA). Η ποσοτική PCR είναι γνωστή και ως qPCR (quantitative PCR). Επίσης, τα αποτελέσματα της RT-PCR, μπορούν να αξιολογηθούν χωρίς ηλεκτροφόρηση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα μειωμένο κόστος και αυξημένη απόδοση. Τέλος, οι

αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε κλειστό σύστημα, επομένως ελαχιστοποιείται η πιθανότητα μόλυνσης του δείγματος.

Ο τρόπος λειτουργίας της RT-PCR, βασίζεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Εικόνα 20. Διάγραμμα ενίσχυσης μίας αντίδρασης RT-PCR.

Στο διάγραμμα ροής εμφανίζονται δύο φάσεις: Μία εκθετική που ακολουθείται από μία μη εκθετική φάση. Κατά την εκθετική φάση το ποσό των προϊόντων της PCR σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Καθώς προχωρεί η αντίδραση, όμως, τα συστατικά της αντίδρασης καταναλώνονται και τελικά, ένα ή περισσότερα συστατικά περιορίζονται. Στο σημείο αυτό, η αντίδραση επιβραδύνεται και εισέρχεται στη φάση του πλατό (28^{ος}-40^{ος} κύκλος). Αρχικά ο φθορισμός παραμένει στα ίδια επίπεδα και δεν εντοπίζεται αύξηση του φθορισμού. Τελικά, συσσωρεύεται αρκετό ενισχυμένο προϊόν για να αποδώσει σήμα φθορισμού. Ο κύκλος της αντίδρασης στον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται κατώφλι κύκλου (threshold cycle, C_T). Ο κύκλος αυτός καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα του δείγματος που υπάρχει στην αρχή της αντίδρασης. Εάν υπάρχει μεγάλη ποσότητα δείγματος στην αρχή της αντίδρασης τότε θα χρειαστούν λίγοι κύκλοι ενίσχυσης για να αποδοθεί το σήμα φθορισμού. Έτσι η αντίδραση θα εμφανίσει μικρό C_T . Αντίθετα εάν η αρχική ποσότητα δείγματος είναι μικρή, θα χρειαστούν περισσότεροι κύκλοι ενίσχυσης για το φθορίζον σήμα, και έτσι η αντίδραση θα έχει υψηλό C_T .

3.7 Σχετική ποσοτικοποίηση

Η qRT-PCR είναι η πιο ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος ειδικά για μετάγραφα σε χαμηλή αφθονία σε ιστούς με μικρή συγκέντρωση RNA και για δείγματα με περιορισμένη ποσότητα ιστού.

Η σχετική ποσοτικοποίηση καταγράφει τη σχετική αλλαγή σε επίπεδο έκφρασης του mRNA. Προσδιορίζει τις μεταβολές των επιπέδων mRNA σταθερής κατάστασης ενός γονιδίου σε πολλαπλά δείγματα και το εκφράζει σε σχέση με τα επίπεδα άλλου RNA. Είναι το κατάλληλο εργαλείο για τη διερεύνηση μικρών - σε επίπεδο φυσιολογίας - αλλαγών στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης (Pfaffl, 2006).

3.8 Ανάλυση έκφρασης

Η σύγκριση των επιπέδων mRNA σε διαφορετικά δείγματα μέσω qRT-PCR, απαιτεί κανονικοποίηση των τιμών έκφρασής τους. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται ως *γονίδιο αναφοράς* ένα γονίδιο σταθερής έκφρασης σε όλους τους ιστούς, το οποίο ονομάζεται *housekeeping gene*. Με την ενίσχυση του γονιδίου αυτού επιτυγχάνεται η αντιστάθμιση πειραματικών σφαλμάτων όπως είναι ο τεχνικός χειρισμός των δειγμάτων, η διαφορετική απόδοση σε αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής κ.ά. Η σχετική έκφραση είναι η κανονικοποιημένη ποσότητα της αλληλουχίας στόχου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται με τη μέθοδο σύγκρισης των Ct ($\Delta\Delta Ct$) σύμφωνα με τον τύπο (Livak et al, 2001):

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ δείγματος} - \Delta Ct \text{ γονιδίου αναφοράς}]}$$

$$R = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

Η ανάλυση των δειγμάτων της Real-Time PCR έγινε με τη χρήση προγράμματος CFX Manager Software (Bio-Rad CFX96).

3.8.1 Απόδοση (Efficiency)

Ο προσδιορισμός του επιπέδου κατωφλίου CP και συνεπώς η ακρίβεια των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης επηρεάζονται από την απόδοση ενίσχυσης (efficiency, E). Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας είναι ένας σημαντικός δείκτης και η διόρθωση είναι απαραίτητη για τη ποσοτικοποίηση γονιδίου σε πραγματικό χρόνο (Rasmussen, 2001; Liu and Saint, 2002a; Liu and Saint, 2002b; Tichopad et al., 2003; Meijerink et al., 2001). Μία σταθερή απόδοση ενίσχυσης σε όλα τα δείγματα που αναλύονται είναι ένα σημαντικό κριτήριο για την αξιόπιστη σύγκριση μεταξύ δειγμάτων. Efficiency ίσο με 2 (τέλειος διπλασιασμός σε κάθε κύκλο) ισούται με 100%. Ο τύπος εύρεσης του efficiency περιγράφεται από την παρακάτω σχέση:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

Όπου το slope προκύπτει από την γραμμή που σχηματίζεται από την πρότυπη καμπύλη.

Υπάρχει η δυνατότητα μετατροπής των υπολογισμών του efficiency στις τιμές που χρησιμοποιούνται στο λογισμικό πρόγραμμα CFX Manager™, χρησιμοποιώντας τις παρακάτω μαθηματικές σχέσεις:

$$E = (\% \text{ Efficiency} * 0.01) + 1$$

$$\% \text{ Efficiency} = (E - 1) * 100$$

Θα πρέπει τα efficiencies να είναι μεταξύ 90 έως 110% και το slope όχι μεγαλύτερο από -3,3.

3.8.2 Στατιστική ανάλυση (GraphPad)

Το λογισμικό GraphPad είναι ένα πρόγραμμα που βοηθάει στην ανάλυση και απεικόνιση των εργαστηριακών δεδομένων. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό *t test*. Το *t test* συγκρίνει τους μέσους όρους δύο ομάδων. Στην παρούσα έρευνα, χρησιμοποιήθηκε για να γίνει σύγκριση των τιμών που προέκυψαν από την ανάλυση γονιδίων για ιστούς που εκτέθηκαν και για ιστούς που δεν εκτέθηκαν σε ολεωρωπαΐνη. Το *t test* συγκρίνει μία μεταβλητή μεταξύ των δύο ομάδων. Εφόσον δεν έγινε ξεχωριστή ανάλυση κάθε ζεύγους και ήταν γνωστός ο μέσος όρος (mean), το standard error of the mean (SEM) και ο αριθμός των δειγμάτων (N), επιλέχθηκε “unpaired” *t test*. Το διάστημα εμπιστοσύνης που εφαρμόστηκε ήταν 95%. Για P values έως 0,060, η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεν θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική, ενώ για P values > 0,060, η διαφορά θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

3.9 Βιοπληροφορική ανάλυση (Bioinformatics)

3.9.1 Omiga

Το πρόγραμμα Omiga (Kramer, 2001) επιτρέπει την εισαγωγή αλληλουχιών, με σκοπό την ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Μετά την εισαγωγή αλληλουχιών, το Omiga επιτρέπει στο χρήστη να παράγει, να αναλύει και να επεξεργάζεται τις ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες. Μπορούν επίσης να αναζητηθούν αλληλουχίες για την παρουσία θέσεων περιορισμού, δομικών μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών αλληλουχίας. Τέλος, το Omiga επιτρέπει γρήγορες αναζητήσεις για περιοχές κωδικοποίησης καθώς και εκκινητές για τη μέθοδο PCR.

Στην παρούσα έρευνα, το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αναγνωστικού πλαισίου των διαθέσιμων mRNA αλληλουχιών και έπειτα, καθορισμό των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούνται από αυτές. Στο λογισμικό αυτό, βασίστηκε ο σχεδιασμός των ομόλογων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real-Time PCR.

3.9.2 Blast

Το BLAST αποτελεί έναν από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους ευριστικούς (heuristic) αλγόριθμους. Ο όρος ευριστικός (heuristic) χρησιμοποιείται για αλγόριθμους που βρίσκουν λύσεις μεταξύ όλων των πιθανών, αλλά δεν εγγυώνται ότι θα βρουν τη βέλτιστη. Τα διαφορετικά είδη Blast είναι:

- Blastn: συγκρίνει μια νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) με μια βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (DNA). Η αναζήτηση γίνεται και στις δύο αλυσίδες. Είναι ένα πρόγραμμα βελτιστοποιημένης ταχύτητας, όχι όμως και ευαισθησίας.
- Blastp: συγκρίνει την ζητούμενη αμινοξική ακολουθία με μια βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών (σύγκριση πρωτεΐνης με πρωτεΐνες).

- Blastx: συγκρίνει μια άγνωστη νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) μεταφρασμένη σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (reading frames) με μια βάση πρωτεϊνικών ακολουθιών του NCBI. Χρησιμοποιείται για την έρευνα πιθανών μεταφρασμένων πρωτεϊνικών προϊόντων μιας άγνωστης νουκλεοτιδικής ακολουθίας.
- tblastn: συγκρίνει την ζητούμενη πρωτεϊνική ακολουθία με μια βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (DNA) του NCBI που μεταφράζεται δυναμικά σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (reading frames).
- tblastx: μετατρέπει μια νουκλεοτιδική ακολουθία (DNA) σε μια πρωτεϊνική ακολουθία σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (reading frames) και μετά τη συγκρίνει με μια βάση νουκλεοτιδικών ακολουθιών του NCBI η οποία έχει μεταφραστεί σε όλα τα πλαίσια ανάγνωσης (reading frames).

3.9.3 MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform)

Το πρόγραμμα MAFFT είναι ένα λογισμικό πρόγραμμα ευθυγράμμισης πολλαπλών αλληλουχιών. Στο πρόγραμμα αυτό εισάγονται αμινοξικές αλληλουχίες για τον εντοπισμό συντηρημένων περιοχών ή υδρόφιλων και υδρόφοβων περιοχών, καθώς και διάφορων μοτίβων. Το MAFFT προσφέρει διάφορες στρατηγικές πολλαπλής ευθυγράμμισης, που κατατάσσονται σε τρεις τύπους: α) *the progressive method* (την προοδευτική μέθοδο), β) *the iterative refinement method* (την επαναληπτική μέθοδο βελτίωσης) με τη χρήση της σταθμισμένης βαθμολογίας αθροίσματος των ζευγών (WSP - weighted sum-of-pairs score), και γ) *the iterative refinement method* με τη χρήση τόσο της WSP, όσο και της βαθμολογίας συνέπειας. Σε γενικές γραμμές, υπάρχει μια ανταλλαγή μεταξύ ταχύτητας και ακρίβειας. Η σειρά ταχύτητας είναι $\alpha > \beta > \gamma$, ενώ η σειρά ακρίβειας είναι $\alpha < \beta < \gamma$.

3.9.4 TMHMM

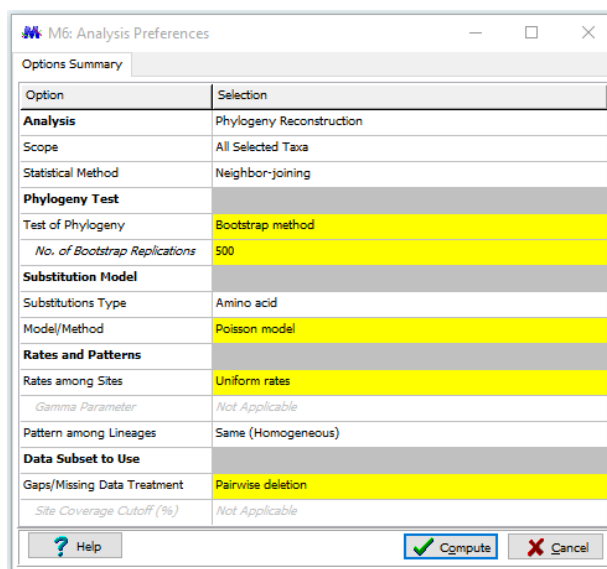
Το TMHMM είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη διαμεμβρανικών περιοχών με βάση ένα κρυφό μοντέλο Markov και αναπτύχθηκε από τους Anders Krogh και Erik Sonnhammer. Για το σκοπό αυτό εισάγονται οι αμινοξικές αλληλουχίες ενός οργανισμού.

Σύμφωνα με τους Krogh και Sonnhammer, η μέθοδος προβλέπει σωστά περίπου 97-98% των διαμεμβρανικών περιοχών. Επιπλέον, το TMHMM μπορεί να διακρίνει μεταξύ διαλυτών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών με εξειδίκευση και ευαισθησία πάνω από 99%, αν και η ακρίβεια ελαττώνεται όταν υπάρχουν πεπτίδια σήματος. Αυτός ο υψηλός βαθμός ακρίβειας επιτρέπει να προβλέπονται αξιόπιστα ενσωματωμένες πρωτεΐνες μεμβράνης σε μια μεγάλη συλλογή γονιδιωμάτων.

3.9.5 MEGA

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA 6, όπου έγινε εισαγωγή όλων των αμινοξικών αλληλουχιών του κάθε οργανισμού και

πραγματοποιήθηκε Align μέσω Muscle με πολλαπλή στοίχιση («multiple alignment mode»). Στη συνέχεια επιλέχθηκε η επιλογή Construct/Test Neighbor-Joining Tree και εν συνεχεία μεταβλήθηκε ο αριθμός των Bootstrap replications, καθώς και το Gaps/Missing Data Treatment, όπως απεικονίζεται παρακάτω. Επιλέχθηκε στην τελευταία περίπτωση το pairwise deletion διότι με την επιλογή αυτή αφαιρέθηκαν όλες οι όμοιες αμινοξικές αλληλουχίες και παρέμειναν μόνο οι ανόμοιες προς σύγκριση.



Εικόνα 21. Analysis Preferences στο πρόγραμμα Mega6 με σκοπό την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου

3.9.5.1 Muscle (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation)

Το λογισμικό MUSCLE χρησιμοποιείται για την ευθυγράμμιση πολλών ακολουθιών αλληλουχιών πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων (Edgar et al 2004).

Ο αλγόριθμος MUSCLE προχωρά σε τρία στάδια:

- ❖ *draft progressive*: στο στάδιο αυτό ο αλγόριθμος παράγει μία πρόχειρη πολλαπλή στοίχιση δίνοντας περισσότερη έμφαση στην ταχύτητα, παρά στην ακρίβεια.
- ❖ *improved progressive*: η απόσταση Kimura χρησιμοποιείται για τον επαναπροσδιορισμό του δυαδικού δέντρου που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία της «πρόχειρης» στοίχισης, έτσι ώστε να παράγει μία πιο ακριβή πολλαπλή στοίχιση.
- ❖ *refinement stage*: είναι το τελικό στάδιο, όπου αφαιρούνται τα ανεπιθύμητα στοιχεία από την τελική ευθυγράμμιση πολλαπλής στοίχισης.

Για να γίνει πολλαπλή στοίχιση ενός συνόλου ακολουθιών πρέπει να επιλεγεί ο τρόπος πολλαπλής στοίχισης (multiple alignment mode). Όλες οι ακολουθίες συγκρίνονται μεταξύ τους, επιτρέποντας την κατασκευή ενός δενδρογράμματος (dendrogram) που δείχνει την κατά προσέγγιση ομαδοποίηση των ακολουθιών λόγω της ομοιότητας τους. Η τελική πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών γίνεται χρησιμοποιώντας ως οδηγό αυτό

το δενδρόγραμμα. Αυτό το δενδρόγραμμα, που ονομάζεται και φυλογενετικό δέντρο, δείχνει τις σχέσεις μεταξύ των οργανισμών.

3.9.6 Fig Tree

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό του δέντρου ήταν το Fig Tree Version 1.4.3. Επιλέχθηκε “Align tip labels” και ξεχωριστό χρώμα για το κάθε έντομο που υπήρχε στο φυλογενετικό δέντρο.

3.9.7 PrimerQuest Tool & Oligonalyzer- IDT (Integrated DNA Technologies)

Το λογισμικό αυτό πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των primers.

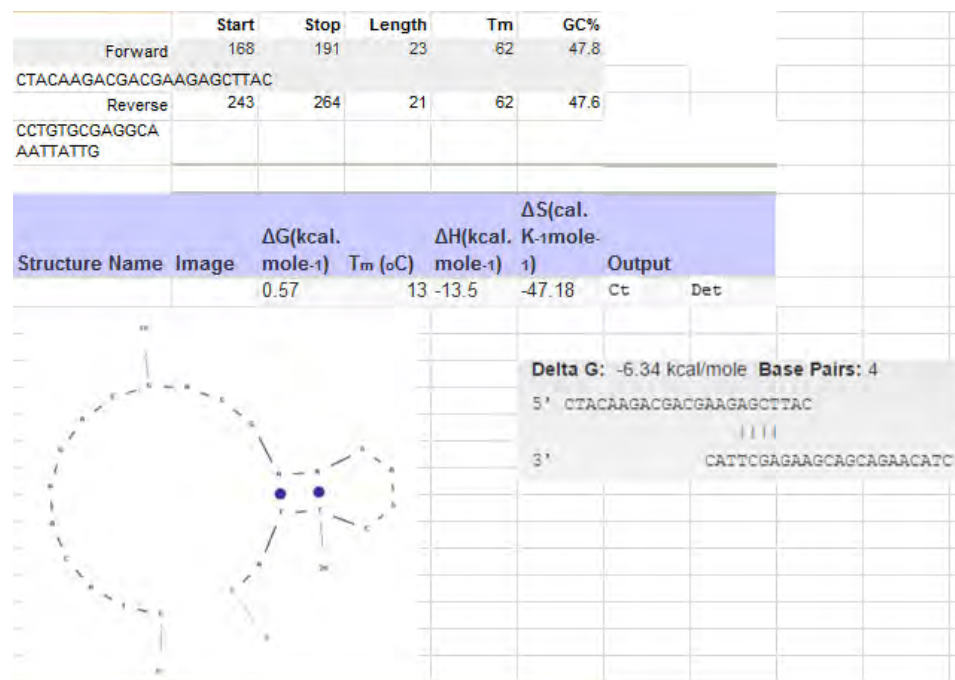
Επιλέχθηκε ως παράμετρος η qPCR Intercalating Dyes (Primers only) και επίσης ρυθμίστηκε το amplicon size (αριθμός των βάσεων του προϊόντος) από 90 έως 130 bp, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

The image shows the 'Task Settings' and 'Reaction Conditions' sections of the PrimerQuest Tool. The 'Task Settings' section includes 'Results' (Results to Return: 5) and 'Vary Forward/Reverse Primer Location' (Off, Low, Med, High). The 'Reaction Conditions' section includes 'Monovalent Salt (Na⁺) (mM): 50', 'Primer DNA Conc (nM): 200', 'Divalent Salt (Mg⁺⁺) (mM): 3', and 'dNTP Conc (mM): 0.8'. The 'Primer Criteria' section includes 'Primer Details' (Min, Opt, Max) and 'Misc Settings' (3' GC Clamp: 0). The 'Amplicon Criteria' section includes 'Amplicon Details' (Min, Opt, Max). The 'Amplicon Size (bp)' is set to 90, 100, 130. The 'Primer Tm (°C)' is set to 59, 62, 65. The 'Primer GC (%)' is set to 35, 50, 65. The 'Primer Size (nt)' is set to 17, 22, 30. The 'Amplicon Size (bp)' is set to 90, 100, 130. The '3' GC Clamp (nt)' is set to 0. The 'Set Design Parameters for...' dropdown menu is open, showing options: General PCR (Primers Only), qPCR (2 Primers + Probe), qPCR Intercalating Dyes (Primers only), Forward Only - Sequencing, and Reverse Only - Sequencing.

Εικόνα 22. Custom Design Parameters στο πρόγραμμα PrimerQuest Tool

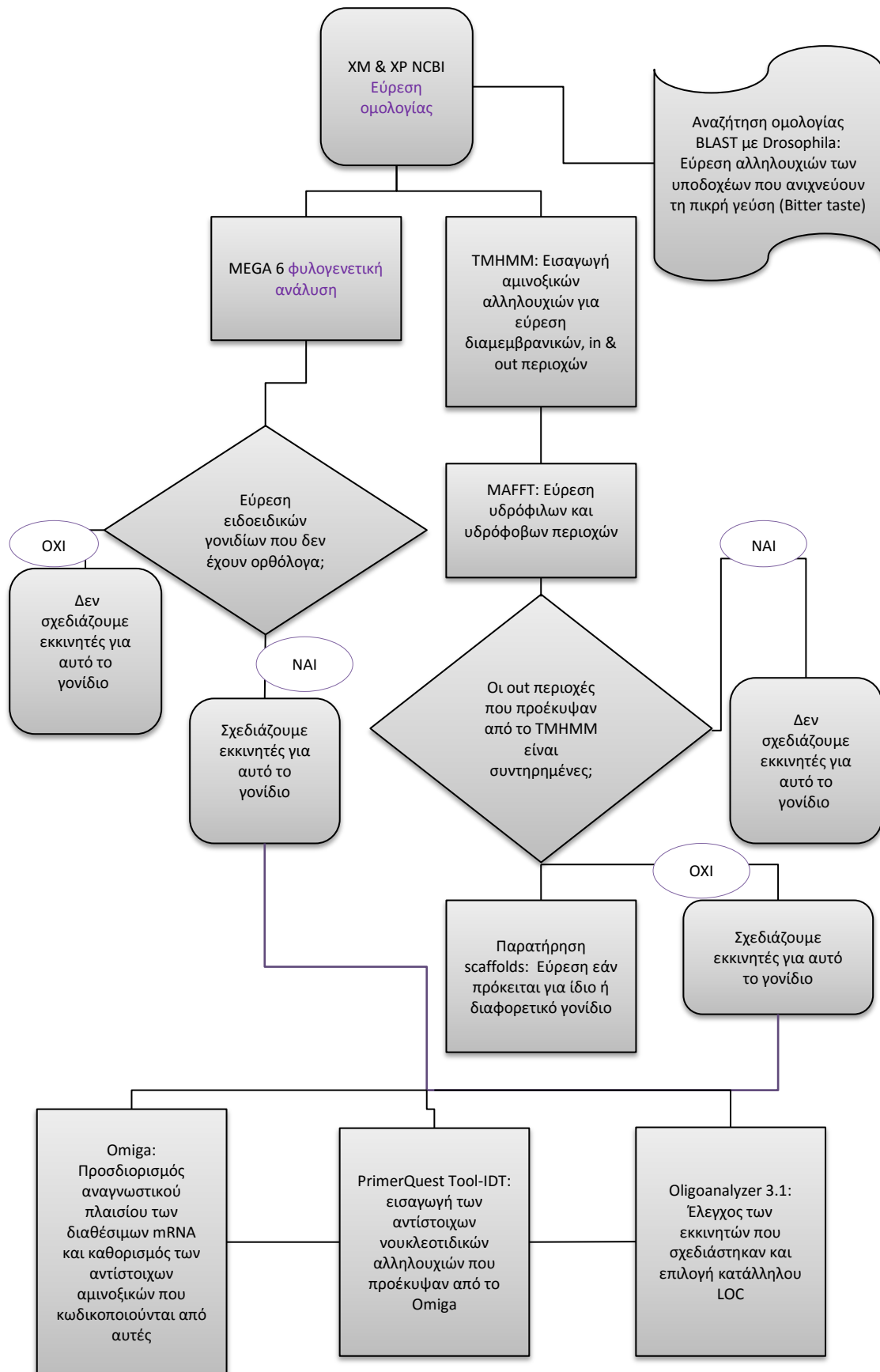
Με τη βοήθεια του Oligoanalyzer 3.1 έγινε ο έλεγχος των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν. Χρησιμοποιώντας τις επιλογές “Hairpin”, “Self-Dimer” και “Hetero-Dimer” παρατηρήθηκε η δομή της κάθε φουρκέτας που σχηματίστηκε, τα ομοδιμερή και

ετεροδιμερή αντίστοιχα, και έτσι επιλέχθηκε προς σχεδιασμό το κατάλληλο LOC του κάθε εκκινητή.



Εικόνα 23. Έλεγχος των χαρακτηριστικών της δομής του κάθε εκκινητή.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



4.1 Βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση γευστικών υποδοχέων

Η βιοπληροφορική ανάλυση ήταν απαραίτητη για να εντοπιστούν τα γονίδια, να ελεγχθεί η ομολογία τους με άλλα συγγενικά είδη, να επιλεγούν οι περιοχές που θα χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό των εκκινητών και, τέλος, να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές, με σκοπό την παρατήρηση έκφρασης των γονιδίων των ιστών που απομονώθηκαν.

4.1.1 Ομολογία

Η πρόσφατη αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου από το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) σε συνεργασία με το Genome Quebec (MacGill University, Canada) και η καταχώρησή του τόσο στη βάση δεδομένων NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LGAM00000000.1>) όσο και στην πλατφόρμα i5k (https://i5k.nal.usda.gov/Bactrocera_oleae) επέτρεψε τον εντοπισμό των γευστικών γονιδίων του εντόμου βάσει ομολογίας. Αρχικά, με τη χρήση του NCBI, βρέθηκαν οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες των γευστικών υποδοχέων του *B. oleae*, σύμφωνα με την αυτόματη επισημείωση (annotation) των ακατέργαστων αλληλουχιών DNA κατά την καταχώρηση του γονιδιώματος. Έτσι, οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες του δάκου εμφανίζονται με τη μορφή **XM** και **XP**, αντίστοιχα. Κάθε καταχώρηση συνοδεύεται από το πρόθεμα XM (mRNA), XR (κωδικοποιημένο RNA) και XP (πρωτεΐνη). Πρόκειται για μοντέλα RefSeqs που παράγονται από τα μέσα πληροφορίας του γονιδιώματος από το NCBI. Έτσι, έγινε καταγραφή των καταχωρήσεων αυτών για τους 53 γευστικούς υποδοχείς του δάκου (Παράρτημα). Μέσω blastp και blastx έγινε επαλήθευση των αμινοξικών αλληλουχιών όπως προέκυψαν από τις νουκλεοτιδικές.

Η εύρεση ομολογίας έγινε με βάση τον οργανισμό *Drosophila*, ο οποίος είναι ένας εκτενώς μελετημένος οργανισμός. Εντοπίστηκαν όλοι οι γευστικοί υποδοχείς (GRs) της *D. melanogaster* για να δειχθεί με ποιους GRs του *B. oleae* αντιστοιχούν. Φάνηκε πως οι GRs των δύο οργανισμών έχουν το ίδιο όνομα καταχώρησης στη βάση δεδομένων NCBI (π.χ. *Bactrocera: Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 2a & *Drosophila: DmelGr2a*).

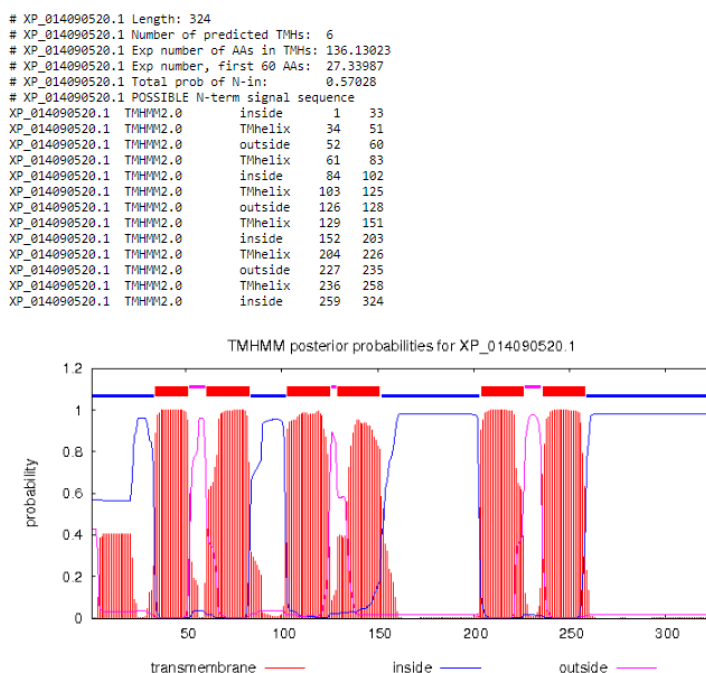
4.1.2 Καθορισμός Διαμεμβρανικών περιοχών

Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα **TMHMM**, όπου εισήχθησαν οι αμινοξικές αλληλουχίες των γευστικών υποδοχέων του δάκου, βρέθηκαν οι διαμεμβρανικές περιοχές, καθώς και οι ενδοκυτταρικές (in) και εξωκυτταρικές (out) περιοχές (στο Παράρτημα σημειώνονται οι **out** περιοχές).

Ο σχεδιασμός των εκκινητών (primers) για τους υποδοχείς που επιλέχθηκαν έγινε εξωκυτταρικά, σύμφωνα με το ότι η οσμή και η γεύση προσλαμβάνονται εξωκυτταρικά. Επομένως θεωρήθηκε πως έτσι, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη εξειδίκευση.

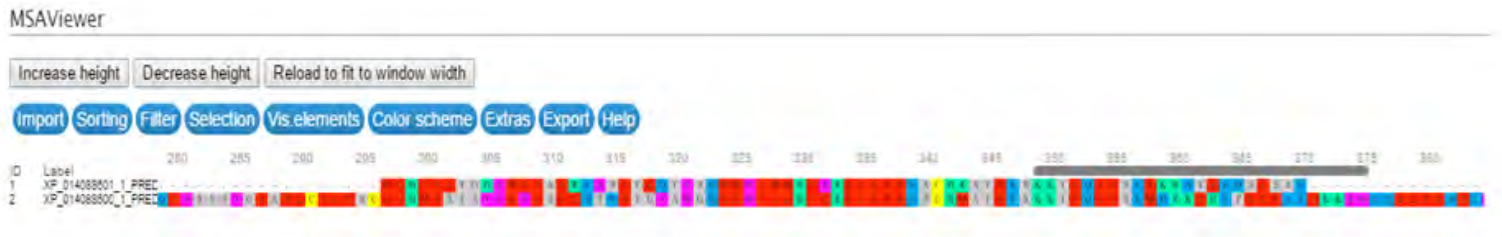
Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός των υποδοχέων έγινε λίγο πριν και λίγο μετά τις εξωκυτταρικές περιοχές, έτσι ώστε αυτές να περιλαμβάνονται πλήρως. Επίσης, ήταν σημαντικό να μην υπάρχει κάποιο μοτίβο στην αρχική ή τελική θέση του υποδοχέα και παρατηρήθηκε ότι, πράγματι, στο C τελικό άκρο δεν υπήρχε κάποιο μοτίβο.

Στην Εικόνα 24 φαίνονται οι διαμεμβρανικές περιοχές όπως προέκυψαν από το πρόγραμμα TMHMM. Συγκεκριμένα απεικονίζονται έξι διαμεμβρανικές περιοχές, τέσσερις ενδοκυτταρικές περιοχές και τρεις εξωκυτταρικές περιοχές. Οι εξωκυτταρικές περιοχές για τον συγκεκριμένο υποδοχέα είναι οι περιοχές 52 – 60, 126 – 128, 227 – 235. Μελετήθηκαν οι εκκινήτες στις περιοχές: 34 – 83, 110 – 150, 217 – 247 και 204 – 217.



Εικόνα 24 . Απεικόνιση TMHMM του γονιδίου XP_014090520.1: putative gustatory receptor 39b [*Bactrocera oleae*]

Επιπλέον για τον εντοπισμό των συντηρημένων και μη περιοχών μεταξύ των αλληλουχιών των μεταγραφόμενων περιοχών των γευστικών γονιδίων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με το πρόγραμμα **MAFFT**. Αυτό έγινε, γιατί ο σχεδιασμός των εκκινήτων γίνεται αποκλειστικά στις μη – ή στις λιγότερο – συντηρημένες περιοχές. Επίσης, στο MAFFT παρατηρήθηκαν οι υδρόφιλες ή υδρόφοβες περιοχές, που βρίσκονται εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα στο MAFFT παρατηρήθηκε αν το out κομμάτι που βρέθηκε από το πρόγραμμα TMHMM είναι συντηρημένο.



Εικόνα 25. Ανάλυση MAFFT για εύρεση συντηρημένων περιοχών (ίδιο χρώμα) μεταξύ των γονιδίων *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106616462), partial mRNA & *Bactrocera oleae* gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106616461), mRNA

4.2 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση εξυπηρέτησε τόσο τον έλεγχο της ειδο – ειδικότητας, όσο και τον έλεγχο ομολογίας, και είχε σκοπό το καταληκτικό συμπέρασμα ως προς το ποια γονίδια θα επιλεγούν για να μελετηθεί η πιθανή τους έκφραση.

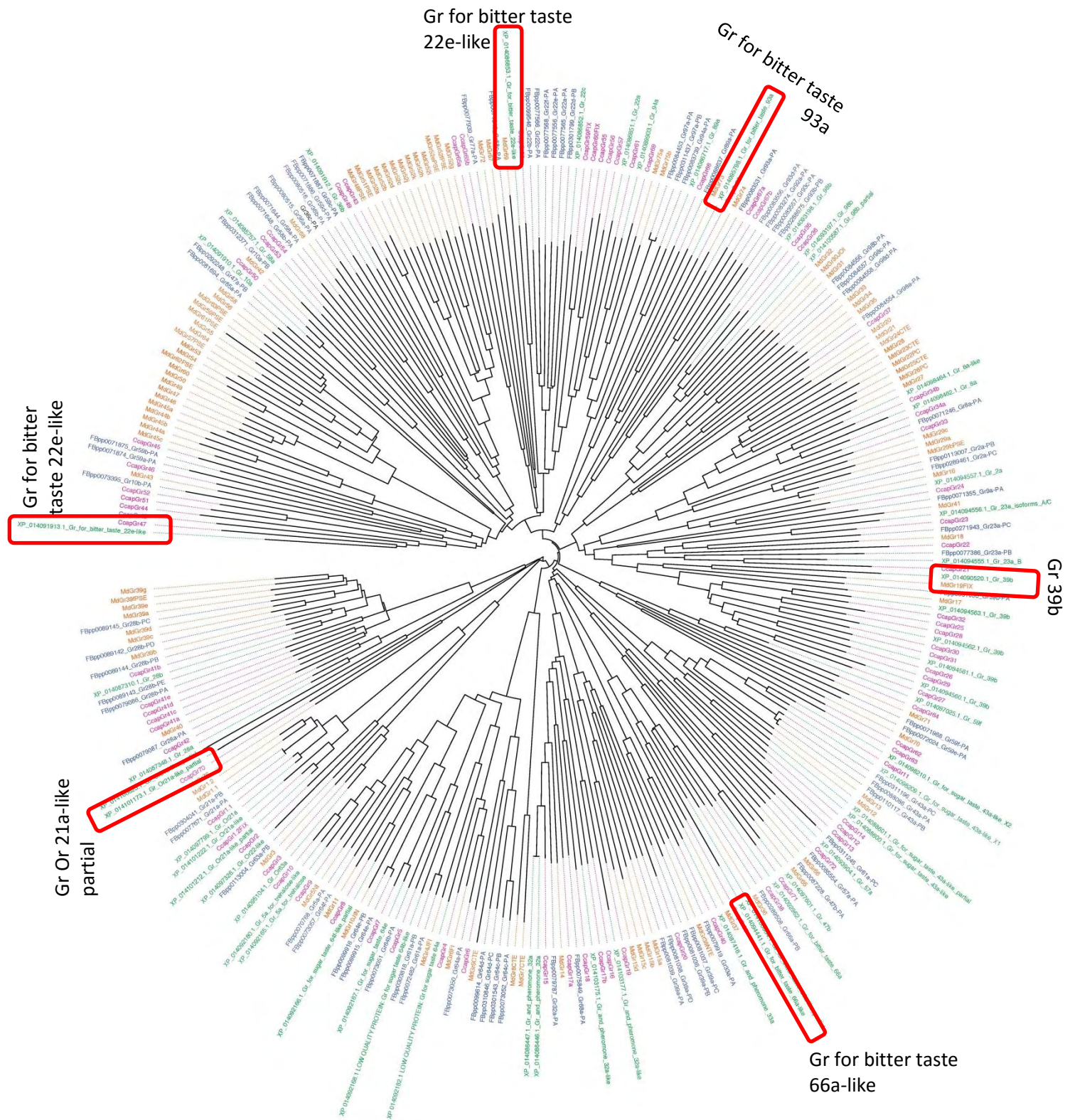
Η φυλογενετική ανάλυση έγινε με τη κατασκευή φυλογενετικού δέντρου, μέσω του οποίου εμφανίζονται οι σχέσεις μεταξύ των οργανισμών. Το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα MEGA6 χρησιμοποιώντας τις αμινοξικές αλληλουχίες του γευστικού συστήματος των παρακάτω οργανισμών:

- ❖ *Bactrocera oleae*
- ❖ *Ceratitis capitata*
- ❖ *Musca domestica*
- ❖ *Drosophila melanogaster*

και πραγματοποιώντας Align μέσω muscle με πολλαπλή στοίχιση.

Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένοι οργανισμοί διότι όλοι ανήκουν στο ίδιο είδος (Δίπτερα) και επιπλέον οι *B. oleae* και *C. capitata* ανήκουν στην ίδια οικογένεια Tephritidae.

- Παρατηρήθηκε ότι, τα γονίδια του *Bactrocera* με το ίδιο κωδικό όνομα **Gr Or21a-like partial**, βρίσκονται στην ίδια διακλάδωση του δέντρου και πιθανόν να είναι ειδο-ειδικά διότι δεν εντοπίζονται συγγενικά γονίδια άλλου οργανισμού στην ίδια διακλάδωση. Τα γονίδια αυτά χαρακτηρίζονται ως παράλογα και επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.
- Αντίθετα, τα γονίδια Gr Or21a, Gr Or21a-like και Gr Or21a-like partial που βρίσκονται στις επόμενες διακλαδώσεις έχουν από ένα μοναδικό ορθόλογο με την *C. capitata* (CcapGr1.1, CcapGr1.2FIX και CcapGr2, αντίστοιχα). Επομένως φάνηκε ότι τα γονίδια αυτά δεν είναι ειδο – ειδικά και πως όταν εκφραστούν θα έχουν την ίδια λειτουργία.
- Το γονίδιο Gr Or63a του *Bactrocera* έχει ένα ορθόλογο με την *C. capitata* (CcapGr3).



Εικόνα 26. Φυλογενετικό δέντρο ανάμεσα στους οργανισμούς *Bactrocera oleae*, *Ceratitis capitata*, *Musca domestica* & *Drosophila melanogaster* [Bootstrap 500, pairwise deletion].

- Εντοπίζονται οι Grs που σχετίζονται με τη γλυκιά γεύση. Έτσι παρατηρείται, ότι οι Gr 5a for trehalose-like, Gr 5a for trehalose, Gr for sugar taste 64f-like partial, Gr for sugar taste 64e, Gr for sugar taste 64b-like και Gr for sugar taste 64a έχουν όλοι ένα μοναδικό ορθόλογο με Gr της *C. capitata*.
- Τα γονίδια Gr32a που σχετίζονται με την αντίληψη των φερομονών είναι παράλογα, ενώ τα Gr32a-like είναι ορθόλογα με τα αντίστοιχα της *C. capitata*.
- Τα γονίδια **Gr66a** σχετίζονται με την **πικρή γεύση** και έχουν επίσης ένα κοινό ορθόλογο με τη *C. capitata*. Ένα τέτοιο γονίδιο επιλέχθηκε να σχεδιαστεί, λόγω του εντοπισμού της πικρής γεύσης, χαρακτηριστικό της ουσίας ολεωρωπαΐνης.
- Οι γευστικοί υποδοχείς **Gr39b**, εντοπίζονται στη μέση του φυλογενετικού δέντρου με πολλά αντίστοιχα μοναδικά ορθόλογα με τα αντίστοιχα της *C. capitata*, εκτός από τον Gr39b, που βρίσκεται στην ίδια διακλάδωση με το γευστικό υποδοχέα MdGr19FIX της *M. domestica*, η οποία όμως δεν θεωρείται στενό συγγενικό είδος με το *Bactrocera*, επομένως ο συγκεκριμένος γευστικός υποδοχέας επιλέχθηκε να σχεδιαστεί για την εξέλιξη του πειράματος.
- Το γονίδιο Gr for bitter taste **93a**, που σχετίζεται επίσης με την ανίχνευση της πικρής γεύσης, επιλέχθηκε να σχεδιαστεί, διότι αν και υπάρχει ένα ορθόλογο στην *C. capitata*, θα ήταν χρήσιμο να παρατηρηθεί έκφραση (up-regulation) ή αποσιώπηση (down-regulation) του γονιδίου, με εφαρμογή ολεωρωπαΐνης.
- Τέλος, το γονίδιο Gr for bitter taste **22e-like**, το οποίο σχετίζεται επίσης με τον εντοπισμό της πικρής γεύσης, επιλέχθηκε προς σχεδιασμό για τον ίδιο σκοπό. Το γονίδιο αυτό έχει επίσης ένα μοναδικό ορθόλογο με τη *C. capitata*.

4.3 Έλεγχος ειδο-ειδικότητας (species specific)

Με σκοπό τον έλεγχο της ειδο-ειδικότητας, κατασκευάστηκε παρόμοιο φυλογενετικό δέντρο με προσθήκη του οργανισμού *Bactrocera dorsalis* για να δειχθεί εάν κάποια γονίδια που στο πρώτο δέντρο εμφανίζονται σε διακλαδώσεις αποκλειστικά του δάκου, είναι κοινά στους δύο οργανισμούς που είναι στενά συγγενικά είδη. Έτσι με κατασκευή του δεύτερου φυλογενετικού δέντρου παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια **Gr Or21a-like partial** αποτελούν πράγματι ειδο-ειδικά γονίδια (species specific genes) του δάκου και δεν εμφανίζονται και στο *B. dorsalis*.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως οι οργανισμοί *B. oleae* και *C. capitata* πράγματι συμπεριφέρονται παρόμοια όσον αφορά τη χημειοαντίληψη των γευστικών τους υποδοχέων, πιθανόν διότι έχουν παρόμοιο οικολογικό περιβάλλον, με βάση το ότι είναι και οι δύο φρουτόμυγες.

Επίσης, για τον έλεγχο της ειδο-ειδικότητας, παρατηρήθηκαν μέσω του NCBI τα scaffolds των γονιδίων του δάκου που μελετήθηκαν. Μελετήθηκαν τα scaffolds διαφορετικών γονιδίων για να δειχθεί εάν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη και εάν οι αλληλουχίες εμφανίζονται στο ίδιο scaffold. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε εάν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των partial γονιδίων ή εάν τα scaffolds αυτών των γονιδίων βρίσκονται πολύ κοντά, για να ληφθεί το συμπέρασμα εάν πρόκειται για ίδιο ή για διαφορετικό γονίδιο. Αλληλοεπικάλυψη στα άκρα θα σήμαινε ότι το ένα γονίδιο είναι η

συνέχεια του άλλου. Αλληλοεπικάλυψη στη μέση θα σήμαινε ότι πρόκειται για το ίδιο γονίδιο. Παρατηρήθηκε ότι οι υποδοχείς που μελετήθηκαν αποτελούσαν όλοι μοναδικά γονίδια και δεν υπήρχε αλληλοεπικάλυψη με άλλα γονίδια.

Το εναλλακτικό μάτισμα (Alternative splicing) είναι ένας βασικός μηχανισμός γενετικής ποικιλότητας στους ευκαρυωτικούς και αιτιολογεί και το μικρό αριθμό γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Από το εναλλακτικό μάτισμα προκύπτουν τα εναλλακτικά μετάγραφα. Εναλλακτικό μετάγραφο σημαίνει διαφορετική πρωτεΐνη, επομένως διαφορετικό XP και επομένως διαφορετικό XM. Εναλλακτικά μετάγραφα μπορεί να προκύψουν αν λείπει μία ολόκληρη περιοχή, ιντρόνια, εξόνια κλπ, δηλαδή αν λείπει ένα ολόκληρο domain της πρωτεΐνης. Μέσω των scaffolds, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχαν εναλλακτικά μετάγραφα όσον αφορά τα γονίδια που μελετήθηκαν.

4.4 Έλεγχος απόκρισης στην ολευρωπαΐνη

Για τον έλεγχο απόκρισης στο κύριο φαινολικό συστατικό της ελιάς που είναι η ολευρωπαΐνη απομονώθηκαν **ο ωοθέτης, τα στοματικά μόρια και ο θώρακας ενηλίκων θηλυκών *Bactrocera olea***. Πραγματοποιήθηκαν δύο χειρισμοί με ολευρωπαΐνη και δύο χειρισμοί με ακετόνη (μάρτυρες). Για κάθε περίπτωση απομονώθηκαν ξεχωριστά, 5 ιστοί ωοθέτη, 3 ιστοί στοματικών μορίων και 2 ιστοί θώρακα. Η συγκέντρωση ολευρωπαΐνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν **7,7 ng/μL**.

Πίνακας 2. Αναλυτική περιγραφή του τρόπου με τον οποίο έγιναν οι χειρισμοί.

Δείγμα		Ιστός	Κωδικός Χειρισμού	Χειρισμός	Αριθμός ιστών που απομονώθηκαν
3	Biological set	Ωοθέτης	Ovip #3	control	5
4			Ovip #4	control	5
9	Biological set	Στοματικά μόρια	MP #1	oleuropein	3
10			MP #2	oleuropein	3
11	Biological set		MP #3	control	3
12			MP #4	control	3
17	Biological set	Θώρακας	Thr #1	oleuropein	2
18			Thr #2	oleuropein	2
19	Biological set		Thr #3	control	2
20			Thr #4	control	2

Στη συνέχεια, απομονώθηκε **RNA** από τους ιστούς και διατηρήθηκε σε διάλυμα TRI reagent. Ακολούθησε κατεργασία με DNase, με σκοπό να αφαιρεθούν τυχόν τμήματα DNA που δεν είχαν μετατραπεί σε RNA, και έπειτα έγινε η σύνθεση **cDNA**, για να αναλυθούν τα δείγματα με τη μέθοδο **Real Time PCR**.

4.5 Ανάλυση έκφρασης

Για την ανάλυση έκφρασης ήταν απαραίτητος ο σχεδιασμός εκκινητών για τους συγκεκριμένους υποδοχείς που επιλέχθηκαν.

Η επιλογή των υποδοχέων έγινε με βάση το φυλογενετικό δέντρο που σχεδιάστηκε, καθώς και με βάση τις ιδιότητες του κάθε υποδοχέα. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν οι υποδοχείς που απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3. Γευστικοί υποδοχείς του *B. oleae* που επιλέχθηκαν για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος.

Receptor	XM code	XP code	size
Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106617681), mRNA	XM_014235045	XP_014090520	975 bp linear mRNA
Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 93a (LOC106621446), mRNA	XM_014240323	XP_014095798	1,010 bp linear mRNA
Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625878), partial mRNA	XM_014245698	XP_014101173	834 bp linear mRNA
Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625323), partial mRNA	XM_014245148	XP_014100623	600 bp linear mRNA
Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106618635), mRNA	XM_014236438	XP_014091913	720 bp linear mRNA
Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106620458), mRNA	XM_014238966	XP_014094441	861 bp linear mRNA

- *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor **39b** (LOC106617681): Ο υποδοχέας αυτός επιλέχθηκε, γιατί με μελέτη του φυλογενετικού δέντρου παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δε σχετίζεται με παρόμοιο γονίδιο που υπάρχει στη *C. capitata* που ανήκει στην ίδια οικογένεια με το *B. oleae*.
- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **93a** (LOC106621446): Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε με βάση την εξειδίκευσή του ως προς την πικρή γεύση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ολεωρωπαΐνη είναι μία πικρή ένωση, και έτσι εξειδίκευση σε αυτό το χαρακτηριστικό θα ήταν χρήσιμο για την έκφραση του γονιδίου σε έκθεση ολεωρωπαΐνης.
- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor **21a-like** (LOC106625878) & *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor **21a-like** (LOC106625323): Αυτά τα γονίδια βρίσκονται στην ίδια διακλάδωση του φυλογενετικού δέντρου και αποτελούν τόσο γευστικά όσο και οσφρητικά

γονίδια. Η επιλογή και των δύο γονιδίων έγινε μετά από παρατήρηση των scaffolds, για να διαπιστωθεί ότι δεν βρίσκονται στο ίδιο scaffold, αλλά ούτε και κοντά μεταξύ τους, επομένως πρόκειται για διαφορετικά γονίδια. Στο φυλογενετικό δέντρο, προστέθηκε ο οργανισμός *B. dorsalis* για να διαπιστωθεί εάν αυτά τα γονίδια βρίσκονται και στον οργανισμό αυτό, αλλά βρέθηκε ότι βρίσκονται μόνο στο *B. oleae*.

- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106618635): Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε, επίσης, γιατί παρουσιάζει εξειδίκευση στην πικρή γεύση.
- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106620458): Το γονίδιο αυτό επιλέχθηκε εξαιτίας της ιδιότητας του ανίχνευσης της πικρή γεύσης.

Ο σχεδιασμός των εκκινήτων έγινε στις εξωκυτταρικές περιοχές, με το πρόγραμμα **PrimerQuest Tool- IDT (Integrated DNA Technologies)**, αφού υποβλήθηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του δάκου, αντίστοιχες των αμινοξικών που προσδιορίστηκαν από το **Omiga**. Οι διαμεμβρανικές περιοχές καθορίστηκαν από το πρόγραμμα TMHMM καθώς και οι ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικές περιοχές.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος των primers στο πρόγραμμα **oligoanalyzer 3.1**, για να παρατηρηθεί εάν υπάρχουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, κάτι που θα δημιουργούσε πρόβλημα στη διεξαγωγή του πειράματος με τη χρήση Real Time PCR.

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η **α -tub**, διότι έχει βρεθεί ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται σταθερά σε όλους τους υπό εξέταση ιστούς με απόδοση (efficiency) 104,6% (Sagri et al., 2017).

Για κάθε υποδοχέα ξεχωριστά, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας τις παρακάτω αραιώσεις:

Διαδοχικές Αραιώσεις	
1/5	2,00E-01
1/10	1,00E-01
1/50	2,00E-02
1/100	1,00E-02

Με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς, ανάλυση των δειγμάτων με RT – PCR και ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα CFX Manager, βρέθηκε το efficiency για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά, όπως απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4. Απόδοση (efficiency) των υποδοχέων που επιλέχθηκαν.

Receptor	Efficiency
<i>Bactrocera oleae</i> putative gustatory receptor 39b (LOC106617681)	109.7%
<i>Bactrocera oleae</i> gustatory receptor for bitter taste 93a (LOC106621446)	100%
<i>Bactrocera oleae</i> gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625878)	97.9%
<i>Bactrocera oleae</i> gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625323)	104.1%
<i>Bactrocera oleae</i> gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106618635)	99.7%
<i>Bactrocera oleae</i> gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106620458)	100.6%

Ανάλυση έκφρασης

Μελέτη των αποτελεσμάτων μετά από ανάλυση των γονιδίων (Gene study) στο πρόγραμμα CFX Manager™

Η μελέτη των διαφορετικών γονιδίων που αναλύθηκαν πραγματοποιήθηκε ανά ιστό:

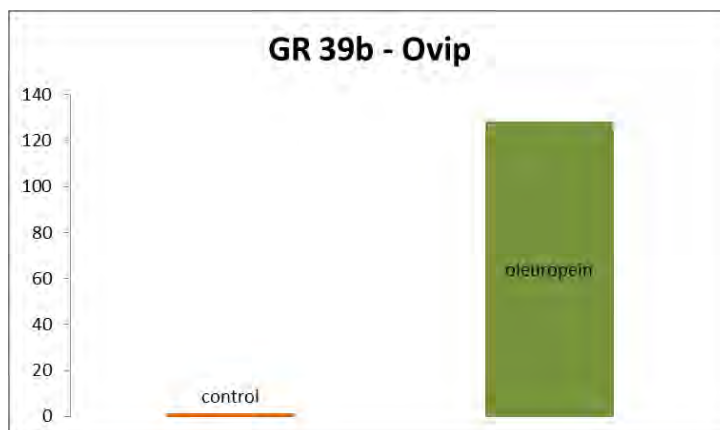
- ❖ Ωοθέτης (ovipositor – Ovip)
- ❖ Στοματικά μόρια (maxillary palps - MP)
- ❖ Μεσονότος (thorax – Thr)

Ωοθέτης (ovipositor – Ovip)

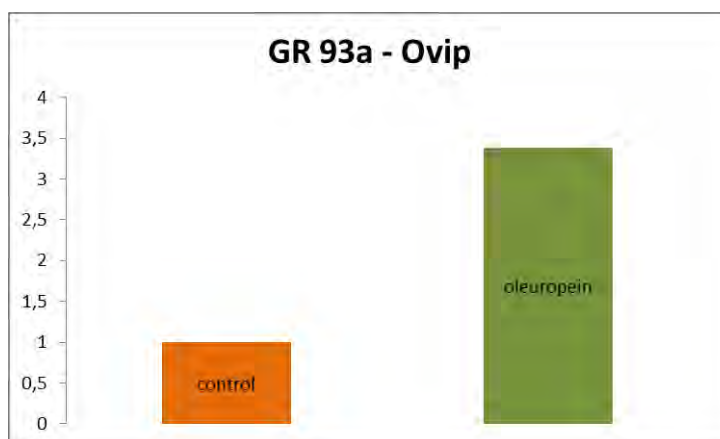
Για τον ιστό αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό σετ και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις δύο εφαρμογές (ολεωρωπαΐνη και control) θεωρήθηκαν κατά πλειονότητα στατιστικά σημαντικές.

Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζονται με πορτοκαλί χρώμα οι χειρισμοί control χρησιμοποιώντας διάλυμα ακετόνης και με πράσινο χρώμα οι χειρισμοί όπου χρησιμοποιήθηκε ολεωρωπαΐνη.

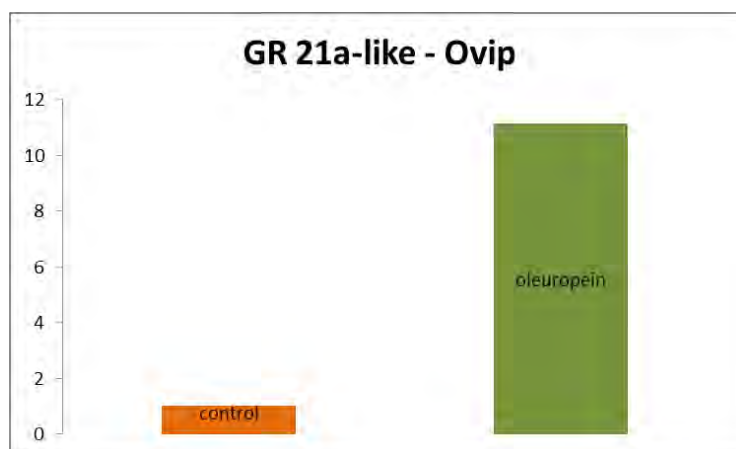
- *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor **39b** (LOC106617681),
(P value= 0.0122)



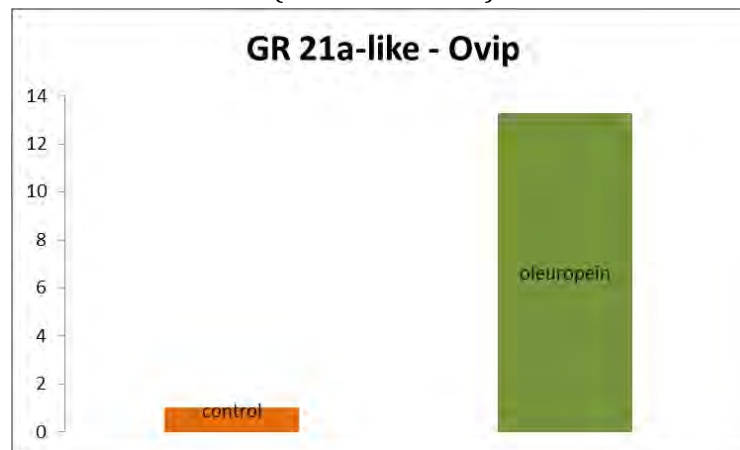
- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **93a** (LOC106621446),
(P value= 0.0575)



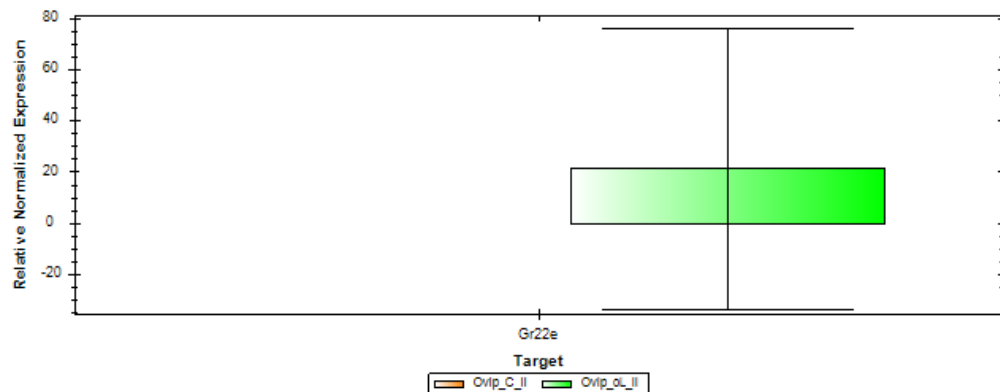
- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor **21a-like** (LOC106625878),
(P value= 0.0104)



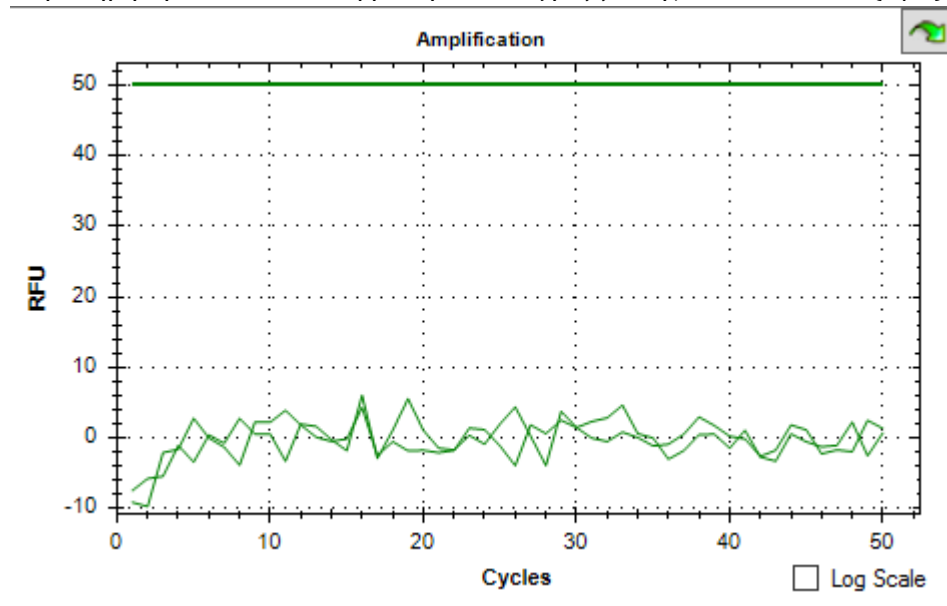
- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor **21a-like** (LOC106625323), (P value= 0.0105)



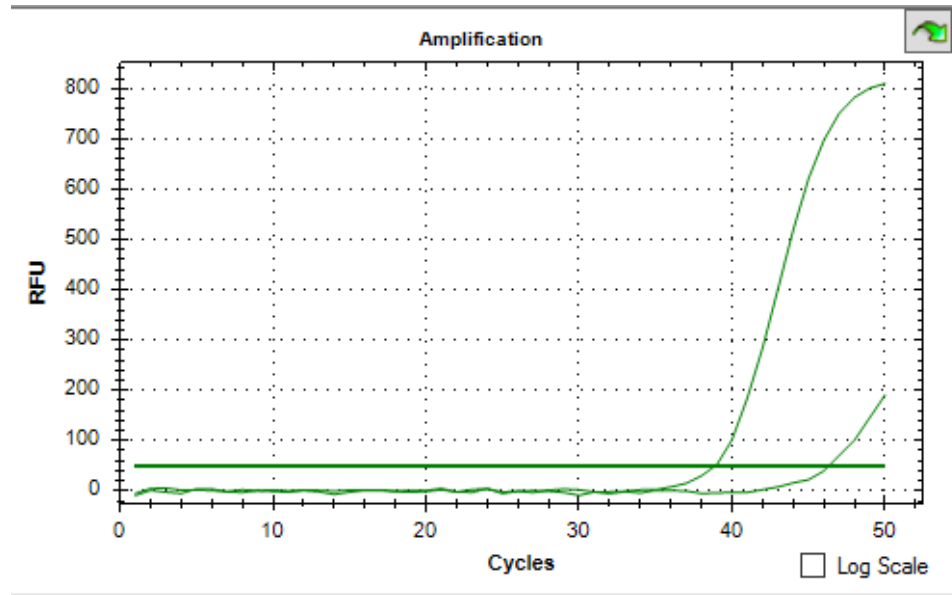
- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **22e-like** (LOC106618635), (P value= 0.9925)



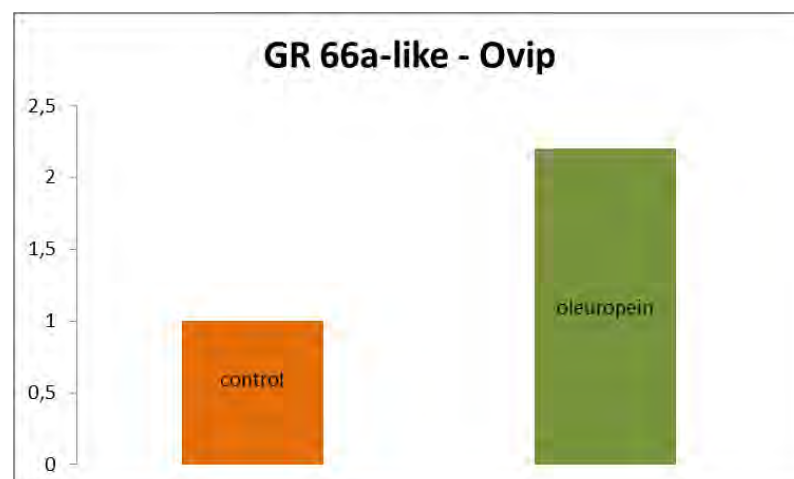
Κατά το Gene Study στο πρόγραμμα Bio-Rad CFX Manager 3.1 το διάγραμμα αυτό εμφανίζεται με αυτή τη μορφή διότι κατά τον χειρισμό control δεν παρατηρήθηκε καθόλου έκφραση στο διάγραμμα της Real time PCR (N/A).



Κατά την εφαρμογή ολευρωπαΐνης οι δύο κύκλοι διέφεραν σημαντικά (38,90 & 46,33) και έτσι το αποτέλεσμα δεν θεωρείται αξιόπιστο. Θα πρέπει σίγουρα να γίνει επανάληψη της περίπτωσης αυτής με νέο ιστό ωοθέτη θηλυκών εντόμων και πιθανόν επανασχεδιασμός του εκκινητή του γονιδίου 22e-like.



- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **66a-like** (LOC106620458), (P value= 0.3548)



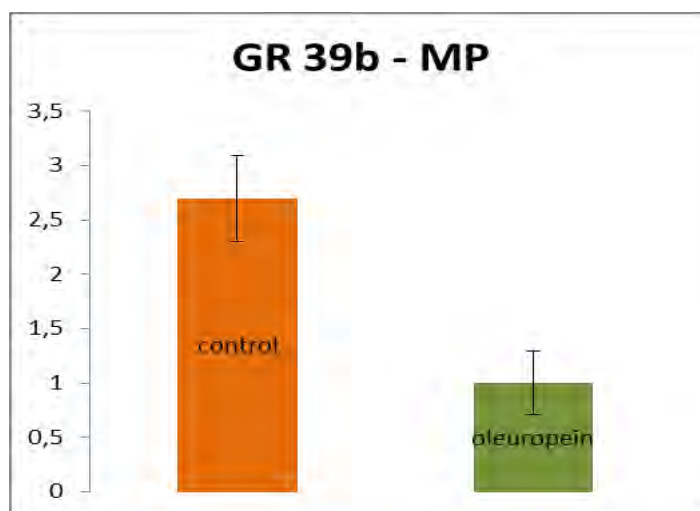
Από τα γραφήματα αυτά παρατηρείται ότι με εναπόθεση ολευρωπαΐνης στους ωοθέτες των θηλυκών ενήλικων εντόμων του δάκου παρατηρείται up-regulation για τα γονίδια **GR 39b**, **GR 93a**, **GR 21a-like(1)** και **GR 21a-like(2)**, καθώς οι διαφορές που παρατηρούνται στα γραφήματα αυτά θεωρούνται στατιστικά σημαντικές σύμφωνα με το πρόγραμμα GraphPad.

Στοματικά μόρια (maxillary palps - MP)

Στον ιστό αυτό δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στην εφαρμογή ολευρωπαΐνης και στα δείγματα Control. Στα παρακάτω γραφήματα απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα ο μέσος όρος των δύο χειρισμών control που έγιναν και αντίστοιχα με πράσινο χρώμα ο μέσος όρος των τιμών των δύο χειρισμών που έγιναν με ολευρωπαΐνη.

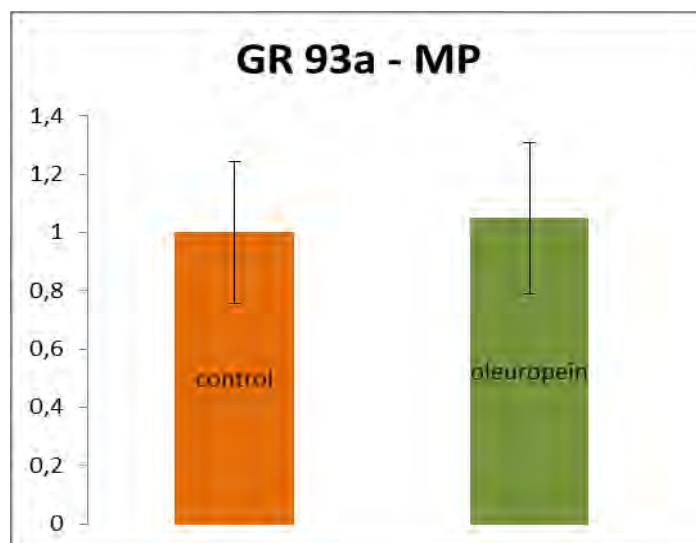
Πιο συγκεκριμένα, όταν ο ιστός αυτός εκτέθηκε σε ολευρωπαΐνη παρατηρήθηκε μικρή στατιστική διαφορά μεταξύ των τιμών των δειγμάτων Control και ολευρωπαΐνης όσον αφορά τον υποδοχέα **39b**. Για να καταλήξουμε σε αυτό το συμπέρασμα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα GraphPad και βρέθηκαν οι P values μεταξύ των δύο biological set δειγμάτων. Για τον υποδοχέα 39b, μέσω του GraphPad βρέθηκε ότι το διάστημα εμπιστοσύνης 95% είναι (-0.4236627, 3.8126227) και η P value ισούται με 0.0750. Επομένως οι δύο βιολογικοί χειρισμοί δεν διαφέρουν σημαντικά.

- *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor **39b** (LOC106617681), (P value=0.0750)

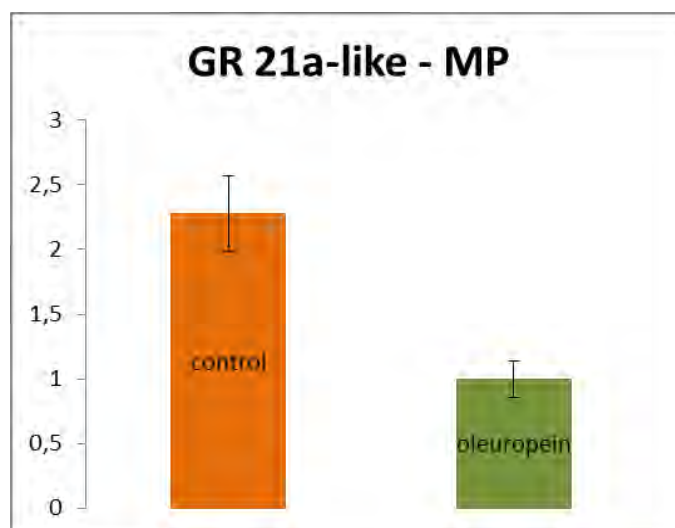


Παρόμοια μελετήθηκαν και οι υπόλοιποι υποδοχείς και εξήχθη το συμπέρασμα ότι στα στοματικά μόρια δεν παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ της εφαρμογής με ολευρωπαΐνη και μη, για τους υποδοχείς 93a, 21a-like (LOC106625323), 22e-like και 66a-like.

- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **93a** (LOC106621446), (P value=0.9045)

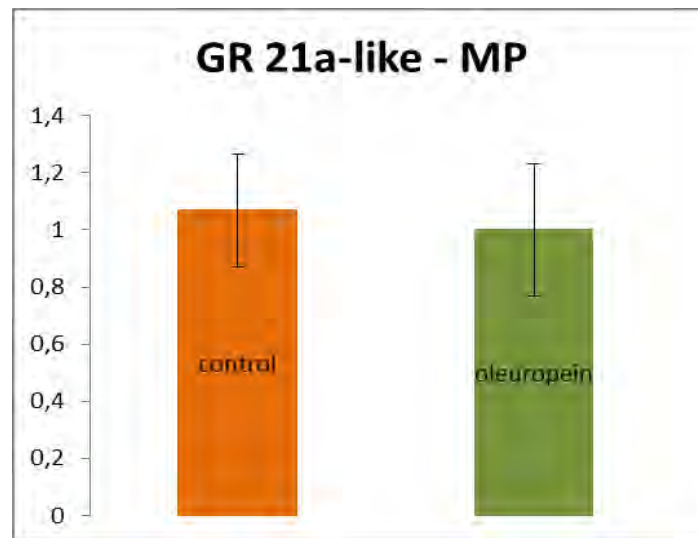


- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor **21a-like** (LOC10662878), (P value=0.0600)

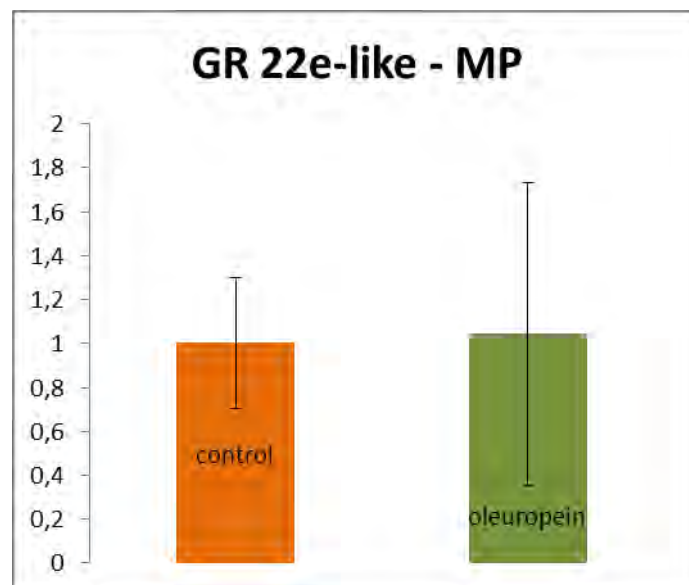


Στο γονίδιο **21a-like** (LOC106625878) παρατηρείται ότι οι τιμές των μέσων όρων των χειρισμών Control και ολευρωπαΐνης παρουσιάζουν οριακή στατιστική διαφορά (P value = 0.0600) και παρατηρείται **down-regulation** κατά το χειρισμό διαλύματος ολευρωπαΐνης στα στοματικά μέρη του θηλυκού εντόμου.

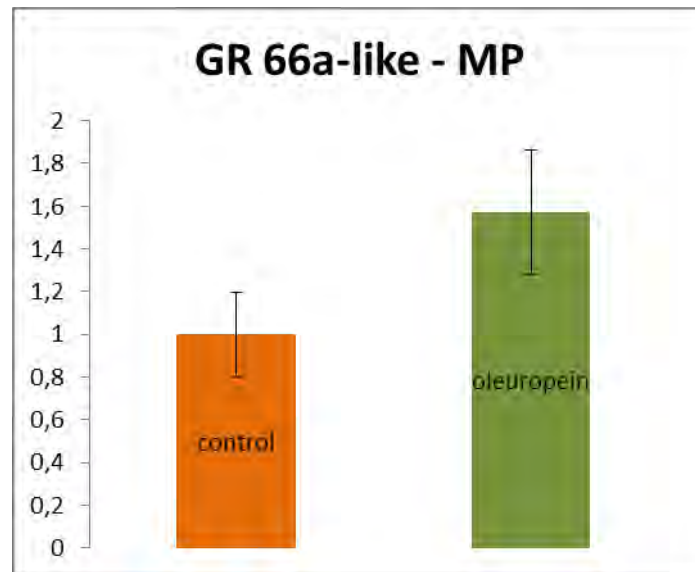
- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor **21a-like** (LOC106625323), (P value= 0.8421)



- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **22e-like** (LOC106618635), (P value= 0.9587)



- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste **66a-like** (LOC106620458), (P value= 0.2471)

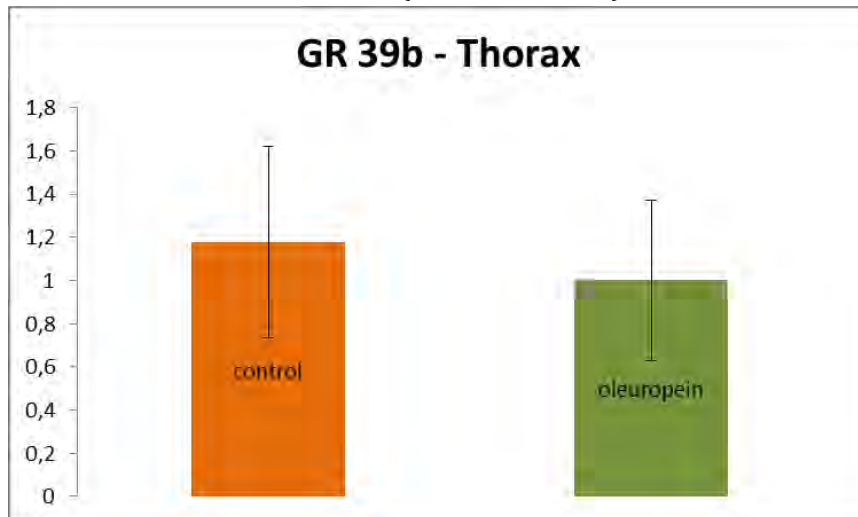


Για το γονίδιο 66a-like, παρατηρείται μία **τάση up-regulation** του γονιδίου με εφαρμογή διαλύματος ολευρωπαΐνης στα στοματικά μόρια του θηλυκού *B. oleae*. Για να επιβεβαιωθεί όμως αυτό θα πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη και να παρατηρείται κατ' εξακολούθηση up-regulation, για να μπορέσει να ληφθεί το συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας εμπλέκεται στην αντίληψη ολευρωπαΐνης.

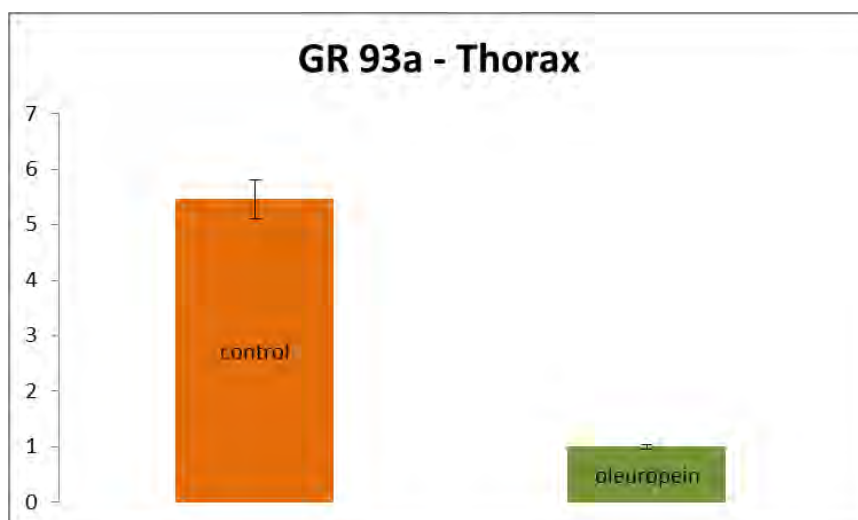
Μεσονότος (thorax - Thr)

Ο μεσονότος αποτελεί τον μεγαλύτερο σε ποσότητα ιστό του εντόμου μεταξύ των τριών που επιλέχθηκαν. Στον ιστό αυτό παρατηρήθηκαν - κατά περιπτώσεις - σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους δύο χειρισμούς που έγιναν, όπως απεικονίζεται και από τα παρακάτω διαγράμματα, όπου με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζονται οι τιμές των χειρισμών Control και με πράσινο χρώμα οι τιμές των χειρισμών με ολευρωπαΐνη.

- *Bactrocera oleae* putative gustatory receptor 39b (LOC106617681),
(P value= 0.7909)

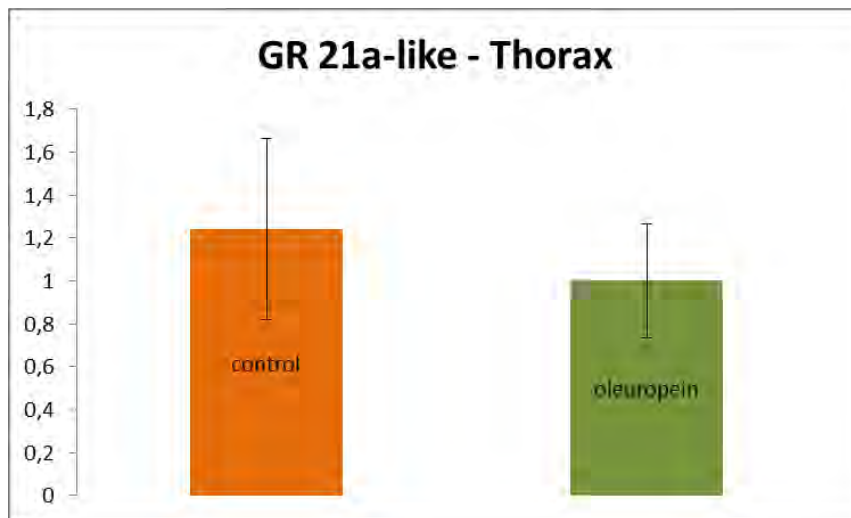


- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 93a (LOC106621446),
(P value= 0.0063)

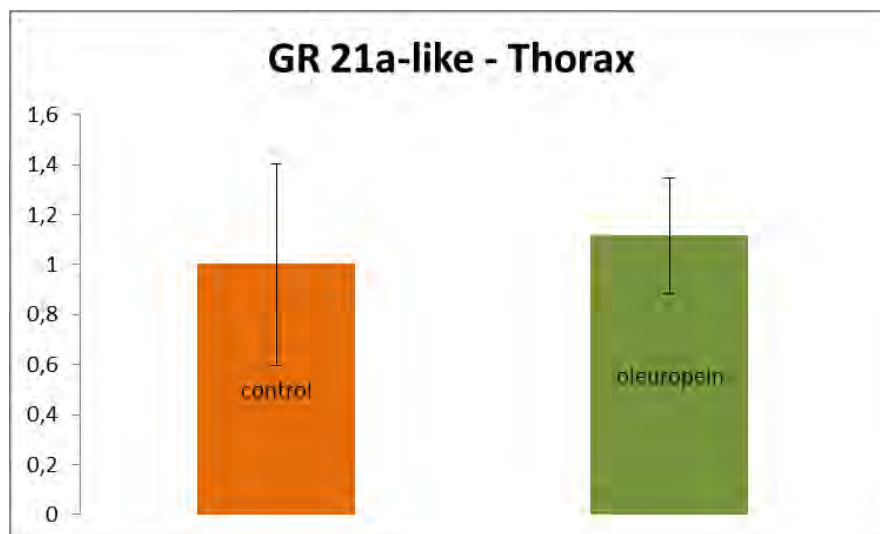


Για το γονίδιο αυτό (GR 93a) παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη στατιστική διαφορά ανάμεσα στους δύο χειρισμούς. Παρατηρήθηκε σημαντικό down-regulation κατά την εφαρμογή ολευρωπαΐνης στον θώρακα ενηλίκων θηλυκών δάκων.

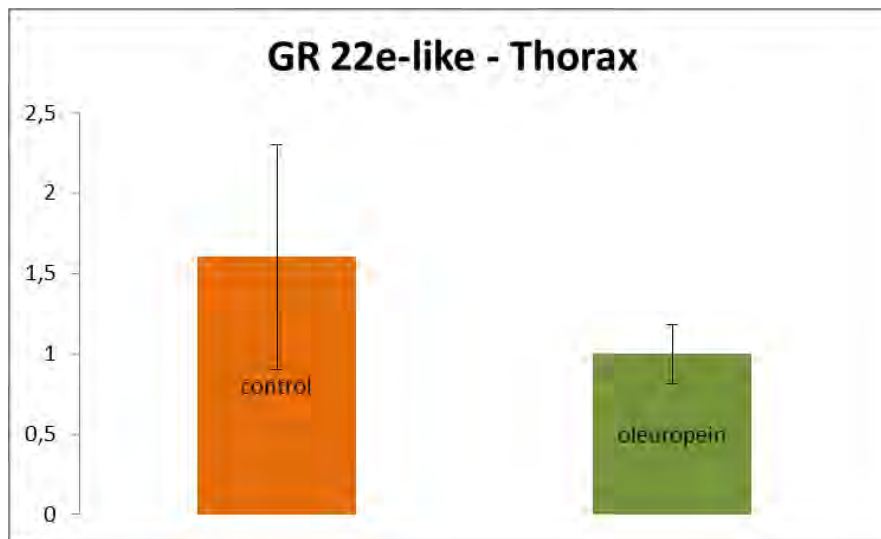
- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625878),
(P value= 0.6773)



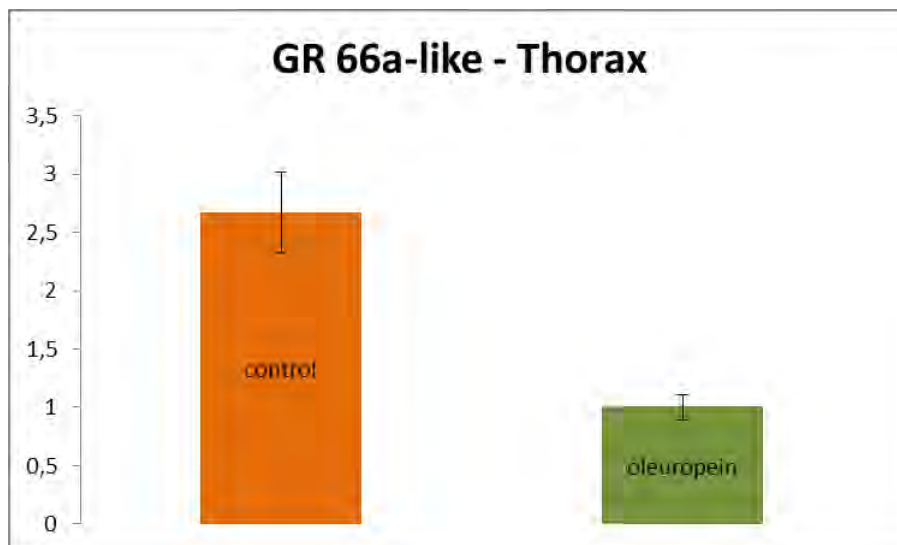
- *Bactrocera oleae* gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625323),
(P value= 0.8303)



- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106618635), (P value= 0.4940)



- *Bactrocera oleae* gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106620458), (P value= 0.0435)



Επίσης στον ιστό αυτό παρατηρείται down-regulation κατά την εφαρμογή ολευρωπαϊνης και η διαφορά ανάμεσα στους δύο χειρισμούς θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Για να επιβεβαιωθεί η έκφραση αυτή θα χρειαστούν επαναλήψεις των δύο χειρισμών στο θώρακα του ενήλικου θηλυκού εντόμου *B. oleae* για να παρατηρηθεί εάν προκύπτει σταθερά down-regulation των γονιδίων GR 93a και GR 66a-like κατά την εφαρμογή ολευρωπαϊνης.

Στα υπόλοιπα γονίδια, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές (up-regulation ή down-regulation) μεταξύ των δύο χειρισμών.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το πιο επιβλαβές παράσιτο για την ελιά. Το φάσμα των μεθόδων καταπολέμησης του είναι περιορισμένο, διότι επικεντρώνεται σε χημικά εντομοκτόνα (κυρίως πυρεθροειδή και οργανοφωσφορικά) τα οποία έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον, στην υγεία του ανθρώπου, καθώς και στην ανθεκτικότητα του εντόμου. Παρόλα αυτά, γίνονται προσπάθειες για να διευρυνθεί το φάσμα των μεθόδων καταπολέμησης του δάκου. Τα τελευταία χρόνια λαμβάνουν χώρα νέες μέθοδοι καταπολέμησης όπως είναι η χρήση παγίδων με μειονέκτημα την μειωμένη αποτελεσματικότητα λόγω της χαμηλής εξειδίκευσης τους. Η χρήση μεθόδων με μειωμένη εξειδίκευση έχουν ως αποτέλεσμα την εξόντωση ωφέλιμων εντόμων για τον άνθρωπο (π.χ. μέλισσες) ή εντόμων-παρασιτοειδών που δρουν ως φυσικοί εχθροί του δάκου (π.χ. *Eupelmus urozonus*) στο μικροπεριβάλλον της ελιάς.

Σε μία τέτοια προσπάθεια αναζήτησης νέων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου πραγματοποιήθηκε μία μοριακή προσέγγιση που θα εξυπηρετεί την εξειδικευμένη και βιολογική καταπολέμηση του εντόμου. Ως στόχος επιλέχθηκε το γευστικό σύστημα του δάκου της ελιάς, διότι αυτό σχετίζεται με την αναπαραγωγή και επιβίωση του εντόμου. Η χημειοαντίληψη παίζει κυρίαρχο ρόλο στην αναζήτηση συντρόφου, εύρεση του κατάλληλου ξενιστή και γενικότερα εύρεση των κατάλληλων συνθηκών επιβίωσης. Σε αυτή τη διεργασία συμβάλλουν διάφοροι υποδοχείς, μεταξύ των οποίων και γευστικοί. Με εύρεση των υποδοχέων εκείνων που σχετίζονται με την επιλογή του ελαιόκαρπου από τον δάκο και την εναπόθεση των αυγών του στο εσωτερικό του καρπού αυτού, θα μπορούσε να καταστεί δυνατό να γίνει σύνθεση ενός μορίου που να παρεμποδίζει τους υποδοχείς αυτούς. Μία εναλλακτική προσέγγιση θα ήταν γνωρίζοντας τους υποδοχείς αυτούς, να γίνει σύνθεση ενός μορίου που θα δρά ως ελκυστικό και έτσι ο δάκος να κατευθύνεται προς το μόριο αυτό και όχι να προσβάλλει και να καταστρέφει τον ελαιόκαρπο.

Ως μέσον για την ανάπτυξη της μοριακής μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η ουσία ολευρωπαΐνη που αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (*Olea europaea*), από την οποία και ονομάστηκε. Έτσι, μελετήθηκε η απόκριση γονιδίων των γευστικών υποδοχέων συγκεκριμένων ιστών (ωοθέτης, στοματικά μόρια, μεσονότος) στην ουσία αυτή. Οι ιστοί απομονώθηκαν από ενήλικα θηλυκά έντομα τα οποία ήταν σεξουαλικά ώριμα. Εύρεση του υποδοχέων εκείνων που εκφράζονται παρουσία ολευρωπαΐνης, θα είχε εν δυνάμει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα σύνθεσης μίας άλλης ουσίας περισσότερο ελκυστικής από την ολευρωπαΐνη, έτσι ώστε να προσελκύεται ο δάκος σε μία παγίδα ωοαπόθεσης.

Η συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί επιλέχθηκε με βάση την τοξική συγκέντρωση της ουσίας αυτής. Η τοξικότητα της ολευρωπαΐνης, όπως και για κάθε ουσία που βρίσκεται στον αέρα ή στο νερό, καθορίζεται από το LC50 αυτής. Σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία δεν έχει βρεθεί το LC50 στην ολευρωπαΐνη για τον δάκο της ελιάς και έτσι ξεκινώντας από μία συγκέντρωση 100μM που σημαίνει 54,05 μg/ml ή 54,05 ng/μl ($M_{\text{oleuropein}}=540,52$) επιλέξαμε να εφαρμόσουμε

συγκεντρώσεις περίπου 7 φορές μικρότερες (7,7ng/μL). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιλογή της συγκέντρωσης ήταν κατά ένα μεγάλο ποσοστό αυθαίρετη, μιας και αυτή είναι η πρώτη έρευνα που γίνεται υπό το πρίσμα του να δειχθεί εάν παρουσιάζεται υπέρ- ή υπο-έκφραση των γευστικών υποδοχέων που επιλέχθηκαν στην ουσία ολευρωπαΐνη.

Ακολούθησε μελέτη για την αναζήτηση του βέλτιστου διαλύτη της ολευρωπαΐνης. Για την εξέλιξη του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν στοιχεία που προέκυψαν από έρευνα των Ivana Generalić Mekinić et al. (2014) όπου μελετήθηκε η διαλυτότητα της ολευρωπαΐνης σε διάφορους διαλύτες. Τα συμπεράσματα που λήφθηκαν από την έρευνα αυτή είναι ότι η ανάκτηση που λήφθηκε χρησιμοποιώντας μεθανόλη και αιθανόλη (50:50, v/v) ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη χρήση υδατικών διαλυτών.

Οι Ivana Generalić Mekinić et al. μελέτησαν τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης: Μεθανόλη : νερό (50:50, v/v), Αιθανόλη : νερό (50:50, v/v), Θερμό νερό και Νερό σε θερμοκρασία δωματίου, σε τρεις διαφορετικές καλλιέργειες (*Oblica*, *Lastovka*, *Levantinka*). Το υψηλότερο μέρος των ολικών φαινολών και της ολευρωπαΐνης ανιχνεύθηκε σε αιθανολικό εκχύλισμα *Lastovka*, ενώ χρησιμοποιώντας υδατικά εκχυλίσματα, τόσο θερμού νερού όσο και νερού θερμοκρασίας δωματίου, ελήφθησαν δύο φορές χαμηλότερα αποτελέσματα (Ivana Generalić Mekinić et al., 2014).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε ως αρχικός διαλύτης αιθανόλη : νερό 50:50, v/v, για τη βέλτιστη διαλυτοποίηση της ολευρωπαΐνης και στη συνέχεια για τις επιπλέον διαδοχικές αραιώσεις, η ακετόνη.

Για την απόκριση του δάκου στην ουσία αυτή επιλέχθηκαν οι GRs του εντόμου, διότι η ολευρωπαΐνη δεν είναι πτητική αλλά βρίσκεται με τη μορφή διαλύματος επομένως θεωρείται πως ανιχνεύεται από τους υποδοχείς αυτούς.

Στο έντομο *B. oleae*, η ανίχνευση της πικρής γεύσης δεν δηλώνει μόνο την παρουσία κάποιας δυσάρεστης, πικρής ή τοξικής ουσίας, όπως συμβαίνει σε άλλα έντομα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, το έντομο αυτό είναι μονοφάγο και εναποθέτει τα αυγά του στο εσωτερικό του καρπού της ελιάς. Η ολευρωπαΐνη που βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στον ελαιόκαρπο είναι μία πικρή ένωση. Πέρα από το γεγονός ότι ο μεταβολισμός της ολευρωπαΐνης απαιτεί την παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων (για ανασκόπηση του μικροβιώματος του δάκου: Ras et al., 2017), η πικρή γεύση της ολευρωπαΐνης δεν αποτελεί αποκρουστικό παράγοντα αλλά αντίθετα είναι το μέρος όπου εναποθέτει τα αυγά του το θηλυκό *B. oleae*.

Οι περισσότερες μύγες αποφεύγουν τις παρεμποδιστικές συνθήκες των ανώριμων καρπών και τείνουν να εναποθέτουν τα αυγά τους στους ώριμους καρπούς που ευνοούν περισσότερο την ανάπτυξη της προνύμφης, καθώς και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Οι μη ώριμοι καρποί είναι συνήθως ανθεκτικοί στην επίθεση από φυτοφάγους και παθογόνους οργανισμούς εξαιτίας του υψηλού επιπέδου σε δευτερογενείς μεταβολίτες με αντι-θρεπτική, αντιμικροβιακή, αποτρεπτική και τοξική δράση, εξασφαλίζοντας έτσι ένα ασφαλές περιβάλλον για την ωρίμανση του καρπού (Whitehead & Bowers, 2013; Gutierrez-Rosales et al., 2012).

Έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη βιβλιογραφία (Ben-Yosef et al., 2015) ότι ο δάκος της ελιάς αποτελεί μία εξαίρεση του κανόνα αυτού. Ο δάκος σχετίζεται άμεσα με το βακτήριο *Candidatus Erwinia dacicola* (Enterobacteriaceae) το οποίο θεωρείται υποχρεωτικό και συν-εξελισσόμενο βακτήριο με το δάκο της ελιάς.

Έχει προταθεί ότι το συμβιωτικό αυτό βακτήριο μπορεί να δώσει στον δάκο της ελιάς ένα πλεονέκτημα που σχετίζεται με την επιβίωση στο δυσμενές περιβάλλον του ανώριμου ελαιοκαρπού, είτε με αποτοξικοποίηση των φαινολικών ενώσεων (π.χ. ολεωρωπαΐνη) είτε με συμμετοχή σε ενζυματική υδρόλυση των διαιτητικών πρωτεϊνών και σύνθεση των αμινοξέων εκείνων που σχετίζονται άμεσα με τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, η οποία είναι περιορισμένη στις πράσινες ελιές.

Έτσι, αν και οι περισσότερες μύγες αναπτύσσονται σε ώριμους καρπούς, ο δάκος χρησιμοποιεί τους ανώριμους καρπούς της ελιάς, κάτι που του επιτρέπει να ολοκληρώνει αρκετές γενιές πριν να είναι διαθέσιμος ο ώριμος ελαιόκαρπος. Αυτή η μοναδική ιδιότητα περιλαμβάνει την αντιμετώπιση άφθονων δευτερογενών μεταβολιτών, ο κύριος από τους οποίους είναι η ολεωρωπαΐνη - ο πικρός φαινολικός γλυκοζίτης που συμβάλλει έως και το 14% του ξηρού βάρους του φρούτου.

Θα ήταν χρήσιμη η κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο συμβαίνει αυτό και αν οι GRs στη φάση της ωοτοκίας ενεργοποιούνται ή αναστέλλονται.

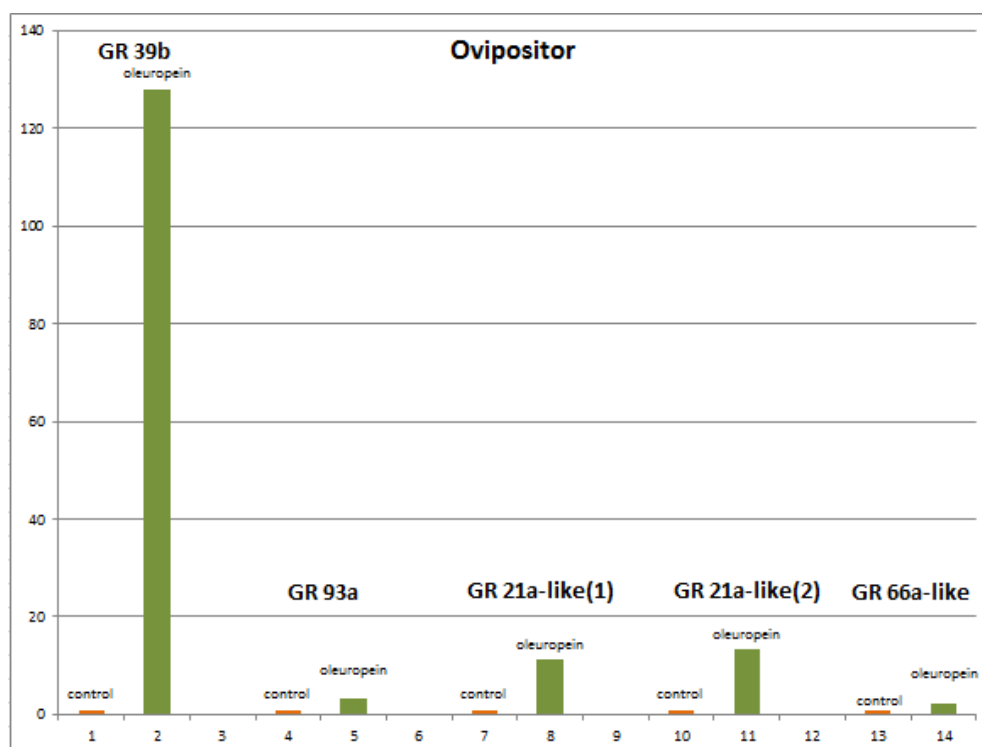
Πιο συγκεκριμένα, θα ήταν χρήσιμο να γνωρίζαμε εάν η ενεργοποίηση των Νευρώνων Γευστικού Υποδοχέα (gustatory receptor neurons - GRN) του ωοθέτη των θηλυκών μπορεί να δημιουργήσει ή να αναστείλει τη συμπεριφορά ωοτοκίας, κάτι που συμβαίνει στα λεπιδόπτερα (Renwick, 1989; Calas et al., 2007).

Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να δημιουργηθεί ένα στοχευμένο σύστημα καταπολέμησης του εντόμου που θα σχετιζόταν αποκλειστικά με τους υποδοχείς GRs, είτε με αναστολή συγκεκριμένων GRs, είτε με σχεδιασμό κατάλληλων φερομονικών παγίδων που θα είχαν ως στόχο την ενεργοποίηση κατάλληλων GRs.

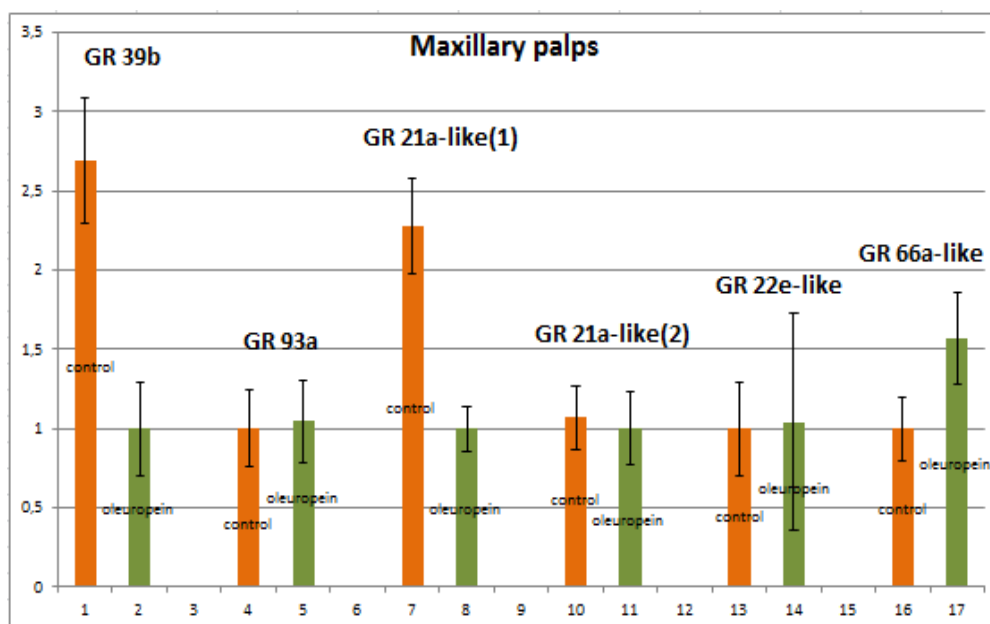
Για να επιλεγούν οι συγκεκριμένοι GRs έγινε μελέτη του φυλογενετικού δέντρου μεταξύ τεσσάρων διαφορετικών οργανισμών (*B. oleae*, *M. domestica*, *D. melanogaster*, *C. capitata*) και έτσι βρέθηκαν ομόλογα γονίδια μεταξύ της *D. melanogaster* και του *B. oleae* για την ανίχνευση της πικρής γεύσης. Επίσης βρέθηκαν ειδο – ειδικά γονίδια του *B. oleae* τα οποία επιλέχθηκαν για να δειχθεί εάν τα γονίδια αυτά που βρίσκονται μόνο στον δάκο εκφράζονται παρουσία ολεωρωπαΐνης.

Έγινε ενίσχυση των γονιδίων που επιλέχθηκαν και απομονώθηκαν από τους ιστούς του ωοθέτη, των στοματικών μορίων και του μεσονότου με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).

Στην περίπτωση των ιστών του ωοθέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα βιολογικό σετ, αλλά τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Σύμφωνα με το t-test η διαφορά ανάμεσα στα δείγματα control και σε αυτά με εφαρμογή ολευρωπαΐνης ήταν – για τα γονίδια GR 39b, 93a, 21a-like(1) & 21a-like(2) – στατιστικά σημαντική. Αυτό ενισχύει το θεώρημα ότι παρουσία ολευρωπαΐνης συγκεκριμένα γονίδια του ωοθέτη ενεργοποιούνται και έτσι γνωρίζοντας ποιά γονίδια είναι αυτά συγκεκριμένα και ποιά η έκφρασή τους σε συγκεκριμένη ποσότητα ολευρωπαΐνης καθίσταται δυνατή η επιλογή της αποσιώπησης αυτών των γονιδίων. Ειδικότερα, το γονίδιο GR 39b που η έκφρασή του παρουσιάζεται 127 φορές πάνω από το δείγμα control αποτελεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Πιθανόν με αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου να μην ήταν τόσο εκλυστικός ο ελαιόκαρπος για την εναπόθεση των αυγών του θηλυκού δάκου.



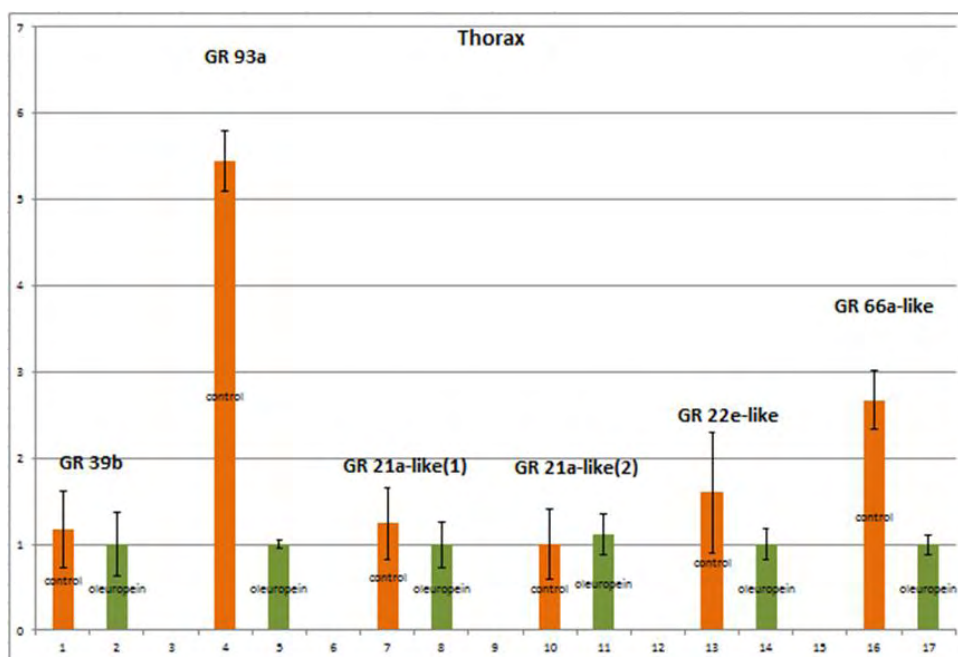
Παρόμοια μελετήθηκε και ο ιστός των στοματικών μορίων όπου χρησιμοποιήθηκαν δύο βιολογικά σετ προς σύγκριση.



Στα στοματικά μόρια δεν παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά σε κανένα γονίδιο ανάμεσα στους δύο χειρισμούς, σύμφωνα με το t test. Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται μία τάση υποέκφρασης στα γονίδια GR 39b & GR 21a-like(1) και μία τάση υπερέκφρασης στο γονίδιο GR 66a-like.

Αυτό υποδηλώνει, είτε ότι τα συγκεκριμένα γονίδια στον ιστό αυτό δεν παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην αντίληψη της ολεωρωπαΐνης, είτε ότι η συγκέντρωση της ολεωρωπαΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα δεν ήταν αρκετή για να υποδείξει πιθανή έκφραση των γονιδίων αυτών. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει το πείραμα να επαναληφτεί χρησιμοποιώντας ένα εύρος συγκέντρωσης ολεωρωπαΐνης για να δειχθεί ποια είναι η συγκέντρωση όπου παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στα δύο δείγματα, στον ιστό αυτό.

Τέλος, εξετάστηκε ο ιστός του θώρακα και χρησιμοποιήθηκε περισσότερο ως ιστός-control, μιας και είναι ο ιστός εκείνος του εντόμου που θεωρητικά δεν συμμετέχει ή συμμετέχει ελάχιστα στην αντίληψη της ολεωρωπαΐνης. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δεν είχαν την έννοια των αποτελεσμάτων ως ιστού-control, μιας και τα αποτελέσματα που προέκυψαν στον ωοθήτη ήταν μοναδικά. Όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω διάγραμμα παρατηρείται υποέκφραση στα γονίδια GR 93a & GR 66a-like. Μάλιστα στο γονίδιο GR 93a η διαφορά είναι ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική σύμφωνα με το t-test. Πιθανόν για τον ιστό αυτό η συγκέντρωση της ολεωρωπαΐνης να είναι τοξική και να προκαλεί υποέκφραση. Γι' αυτό, καθίσταται χρήσιμο να γίνει επανάληψη του πειράματος και να δειχθεί τί συμβαίνει σε ένα εύρος συγκέντρωσης ολεωρωπαΐνης.



Grs σε άλλους οργανισμούς

Σύμφωνα με έρευνα των Gothilf et al. (1971) υπάρχουν χημειοαισθητήρια μόρια στους ταρσούς και στα στοματικά όργανα (tarsal & labellar chemosensilla) του εντόμου *C. capitata*, το οποίο αποτελεί συγγενικό είδος με το δάκο της ελιάς, μιας και είναι και τα δύο φρουτόμυγες της οικογένειας των Tephritidae.

Οι Seok Jun Moon, Youngseok Lee, Yuchen Jiao & Craig Montell (2009) μελέτησαν γευστικούς υποδοχείς της *D. melanogaster*. Τα γονίδια GR 66a και GR 93a χρησιμοποιούνται στην αντίληψη καφεΐνης και το γονίδιο GR 33a φαίνεται να είναι ένας συν-υποδοχέας που απαιτείται για την ανίχνευση όλων των μη πτητικών απωθητικών χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των γευστικών και των φερομονών. Στην έρευνα αυτή φάνηκε πως περίπου 20 GRNs εξέφρασαν το GR 33a και επίσης τα GRNs που οδήγησαν στην έκφραση των Gr33a οδήγησαν επίσης στην έκφραση Gr66a RNA και το αντίστροφο. Το γονίδιο GR 33a εκφράζεται αποκλειστικά ως απόκριση σε απωθητικές χημικές ενώσεις και εκφράζεται επίσης σε αρκετούς GRNs στους ταρσούς.

Επιπλέον όπως αναφέρεται και από τους Erica Gene Freeman & Anupama Dahanukar (2015) οι γευστικοί νευρώνες οργανώνονται σε διάφορες δομές αισθητηρίων τριχιδίων (sensilla) τα οποία διανέμονται σε διάφορα όργανα στο σώμα του εντόμου *Drosophila*. Όργανα που ρυθμίζουν τις διατροφικές συμπεριφορές είναι για παράδειγμα τα στοματικά μόρια στο απώτερο άκρο της προβοσκίδας, τα ταρσικά τμήματα των ποδιών, καθώς και φαρυγγικά όργανα που βρίσκονται στον οισοφάγο. Τα γευστικά αισθητήρια μπορεί επίσης να βρίσκονται και στα πρόσθια κενά των φτερών, καθώς και στον ωοθέτη.

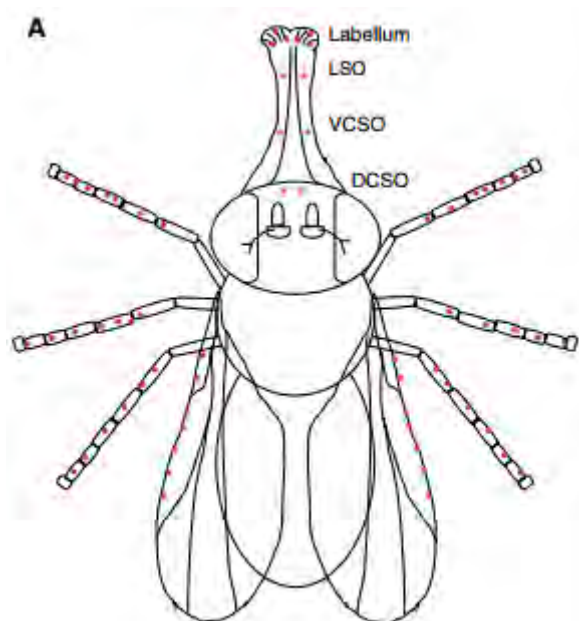
Αναφέρεται πως στα στοματικά μόρια κάθε ένα από τα 60 αισθητήρια περιέχει έως και τέσσερις γευστικούς νευρώνες που είναι μοριακά και από άποψη φυσιολογίας

διακριτοί μεταξύ τους και ενεργοποιούνται επιλεκτικά ανάλογα με το αν η γεύση θεωρείται εύγεστη (γλυκό, αλμυρό, νερό) ή επιβλαβής (υψηλό άλας, πικρό, χαμηλό pH).

Επίσης στη *Drosophila* οι γευστικοί νευρώνες πικρής γεύσης στα S-type sensilla ανταποκρίνονται και σε μεγάλη συγκέντρωση αλάτων.

Σύμφωνα με προηγούμενη βιβλιογραφία οι λειτουργικές τάξεις των νευρώνων που αντιλαμβάνονται τα αποτρεπτικά μόρια στα στοματικά μόρια είναι διακριτές από αυτές που βρίσκονται στους ταρσούς, κάτι που δηλώνει ότι η πικρή γεύση μπορεί να γίνεται αντιληπτή δειγματοληπτικά με διαφορετικό τρόπο από τα διαφορετικά όργανα (Weiss et al., 2011; Ling et al., 2014).

Οι Thorne et al. (2004) και Wang et al. (2004) έχουν αποδείξει στο οργανισμό *Drosophila* ότι το γονίδιο του υποδοχέα της τρεχαλόζης GR 5a εκφράζεται σε περίπου το μισό ποσοστό των νευρώνων των στοματικών μορίων (labellar neurons), ότι το GR 66a και GR 22e εκφράζεται σε ενδιάμεσο ποσοστό νευρώνων και ότι για άλλα GRs το ποσοστό αυτό περιορίζεται σε 1-5%.



Εικόνα 27. *Drosophila*: Τοποθεσία των γευστικών αισθητηρίων. Τα GRNs κατανέμονται στο σώμα της μύγας και απεικονίζονται με κόκκινες τελείες. Συγκεκριμένα κατανέμονται στο labellum, (labral sense organ-LSO), στα ραχιαία και κοιλιακά όργανα(dorsal and ventral cibarial sense organs- VCSO & DCSO) που βρίσκονται στο φάρυγγα. Επιπλέον GRNs περιέχουν τα πόδια όπως και το πρόσθιο μέρος του φτερού. (Hubert Amrein and Natasha Thorne, 2005)

5.1 Μελλοντικές προοπτικές

Έτσι οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ορθώς επιλέχθηκαν και με βάση το φυλογενετικό δέντρο τα συγκεκριμένα γονίδια προς μελέτη στην παρούσα έρευνα, όμως θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον σε μελλοντική έρευνα να μελετηθεί τόσο ένα εύρος συγκέντρωσης ολεωρωπαΐνης όπως προαναφέρθηκε, όσο και επιπλέον ιστοί, όπως αυτός των ταρσών και ακόμη τα φτερά του εντόμου. Όπως έχει αποδειχθεί και από προηγούμενη βιβλιογραφία υπάρχουν γευστικοί υποδοχείς στους ιστούς αυτούς και επομένως θα ήταν χρήσιμο να δείχθεί τί συμβαίνει στους ενδεχόμενους γευστικούς υποδοχείς των ταρσών και φτερών του δάκου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ολεωρωπαΐνης.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Agnihotri** AR, Roy AA & Joshi RS (2016). Gustatory receptors in Lepidoptera: chemosensation and beyond, *Insect Molecular Biology*.
- **Amiot** MJ, Fleuriet A & Macheix JJ (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.34, pp. 823–826.
- **Amiot** MJ, Fleuriet A & Macheix JJ (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation, *Phytochemistry* 28:67-69.
- **Amrein** H & Thorne N (2005). Gustatory Perception and Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, Vol. 15, R673–R684.
- **Augustinos** AA, Mamuris Z, Stratikopoulos EE, D'Amelio S, Zacharopoulou A & Mathiopoulos KD (2005). Microsatellite analysis of olive fruit fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125:231–41.
- **Benavente-Garcia** O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A & Del Rio JA (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chem.* 68, 457-462.
- **Ben-Yosef** M, Pasternak Z, Jurkevitch E & Yuval B. (2015). Symbiotic bacteria enable olive fly larvae to overcome host defences. *R. Soc. open sci.* 2: 150170. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150170>.
- **Blom** F (1978). Sensory input behavioural output relationships in the feeding activity of some lepidopterous larvae. *Entomol Exp Appl* 24: 258–263.
- **Boer** GD & Hanson FE (1987). Differentiation of roles of chemosensory organs in food discrimination among host and non-host plants by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Physiol Entomol* 12: 387–398.
- **Bourquelot** E & Vintilesco JCR (1908). Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retre de l'olivier (*Olea europaea* L.), *Cmpt. Rend. Herbd. Acad. Sci.* 147:533-535.
- **Brenes** M, Rejano L, Garcia P, Sanchez AH & Garrido A (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing, *J. Agric. Food Chem.* 43:2702-2706.
- **Briscoe** AD, Macias-Muñoz A, Kozak KM, Walters JR, Yuan F, Jamie GA et al. (2013) Female behaviour drives expression and evolution of gustatory receptors in butterflies. *PLoS Genet* 9: e1003620.
- **Brown** PE & Anderson M (1998). Morphology and ultrastructure of sense organs on the ovipositor of *Trybliographa rapae*, a parasitoid of the cabbage root fly. *Journal of Insect Physiology* 44 (11), 1017-1025.
- **Burrack** HJ, Connell JH & Zalom FG (2008). Comparison of olive fruit fly (*Bactrocera oleae* (Gmelin)) (Diptera: Tephritidae) captures in several commercial traps in California. *Int J Pest Manag* 2008, 54(3):227–234.
- **Calas** D, Berthier A & Marion-Poll F (2007). Do European corn borer females detect and avoid laying eggs in the presence of 20-hydroxyecdysone? *J Chem Ecol* 33: 1393–1404.
- **Chadha** GK & Roome RE (1980). Oviposition behaviour and the sensilla of the ovipositor of *Chilo partellus* and *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Zoology (Lond.)* 192, 169-178.
- **Chapman** RF, Ascoli-Christensen A & White PR (1991). Sensory coding for feeding deterrence in the grasshopper *Schistocerca americana*. *J Exp Biol* 158: 241–259.
- **Christine** M, Dweck HKM, Vogel M, Vilcinskis A, Stensmyr MC, Hansson BS & Grosse-Wilde E (2014). Evolution of insect olfactory receptors, *eLife*; 3:e02115. DOI: 10.7554/eLife.02115 1 of 22.
- **Cirio** U (1971). Reperti sul meccanismo stimolo-risposta nell'ovideposizione del *Dacus oleae* Gmelin (Diptera, Trypetidae). *Redia* 52, 577-599.
- **Clyne** PJ, Warr CG & Carlson JR (2000). Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* 287:1830–1834. doi: 10.1126/science.287.5459.1830.
- **Clyne** PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J & Carlson JR (1999). A novel family of divergent seven transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* 22:327–338. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81093-4.

- **Copeland** RS, White IM, Okumu M, Machera PB & Wharton RA (2004). Insects associated with fruits of the Oleaceae (Asteridae, Lamiales) in Kenya, with special reference to the Tephritidae (Diptera). *Bishop Mus. Bull. Entomol.* 12:135–64.
- **Crnjar** R, Angioy AM, Pietra P, Stoffolano Jr JG, Liscia A, Tomassini Barbarossa I (1989). Electrophysiological studies of gustatory and olfactory responses of the sensilla on the ovipositor of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh). *Bollettino di Zoologia* 56, 41-46.
- **Crnjar** RM & Prokopy RJ (1982). Morphological and electrophysiological mapping of tarsal chemoreceptors of oviposition-detering pheromone in *Rhagoletis pomonella* flies. *J. Insect Physiol.*, 28 (5): 393-400.
- **Daane** KM & Johnson MW (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology*, Vol.55, pp. 151-169.
- **Dahanukar** A, Hallem EA & Carlson JR (2005). Insect chemoreception, *Current Opinion in Neurobiology*, 15:423–430.
- **Dahanukar** A, Lei YT, Kwon JY & Carlson JR (2007). Two Gr genes underlie sugar reception in *Drosophila*. *Neuron* 56: 503–516.
- **Dawson** TM, Arriza JL, Jaworsky DE, Borisy FF, Attramadal H, Lefkowitz RJ et al. (1993). β -adrenergic receptor kinase-2 and β -arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* 259: 825–829.
- **Dent** D (1991). *Insect Pest Management* C.A.B. International, Oxon, UK (1991)
- **Dethier** VG (1980). Evolution of receptor sensitivity to secondary plant substances with special reference to deterrents. *Am Nat* 115: 45–66.
- **DR** Bottrell (1979) *Integrated pest management*, United States Government Printing Office, Washington, USA.
- **Engsontia** P, Sangket U, Chotigeat W & Satasook C (2014). Molecular evolution of the odorant and gustatory receptor genes in lepidopteran insects: implications for their adaptation and speciation. *J Mol Evol* 79: 21–39.
- **Faucheux** MJ (2012). Ovipositor sensilla of the yellow longicorn beetle *Phoracantha recurva* Newman, 1840 (Coleoptera: Cerambycidae). *Bulletin de l'Institut Scientifique* 34 (1), 11-18.
- **Frazier** JL (1986). The perception of plant allelochemicals that inhibit feeding. Ed. Brattsten, L.B. and Ahmad, S. In *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, pp. 1–42. Springer, US.
- **Freeman** EG & Dahanukar A (2015). Molecular neurobiology of *Drosophila* taste. *Curr Opin Neurobiol.* 2015 Oct;34:140-8. doi: 10.1016/j.conb.2015.06.001. Epub 2015 Jun 21.
- **Freeman** EG, Wisotsky Z & Dahanukar A (2014). Detection of sweet tastants by a conserved group of insect gustatory receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1598–1603.
- **Girolami** V & Ciochetti C (1991). Messaggeri chimici della pianta ospite in *Dacus oleae*. *Atti Convegno "Lotta integrata in viticoltura e olivicoltura"*, Firenze, 20-21 novembre 1991:77-85.
- **Girolami** V & Ciochetti C (1994). Messaggeri chimici dell'olivo in *Bactrocera oleae* (Gmelin) e prospettive di controllo. *Conv. "Innovazioni e prospettive nella difesa fitosanitaria"*, Ferrara, 24-25 ottobre 1994: 229-231.
- **Girolami** V, Crnjar R, Angioy AM, Strapazzon A, Pietra P, Stoffolano Jr JG & Prokopy RJ (1986). Behavior and sensory physiology of *Rhagoletis pomonella* in relation to oviposition stimulants and deterrents in fruit. In: Cavalloro, R. (Ed.), *Fruit Flies of Economic Importance*, 84. A.A. Baljema Pub., Rotterdam-Boston, pp. 183-190.
- **Girolami** V, Strapazzon A, Brian E, Rensi F & Pavan F (1989). Host plant stimulation of oogenesis in *Dacus oleae* Gmel. *Proc. CEC/IOBC Int. Symp. "Fruit flies of economic importance"*, Roma, 7-10 aprile 1987:159-167.
- **Girolami** V, Vianello A, Strapazzon A, Ragazzi E & Veronese G (1981). Ovipositional deterrents in *Dacus oleae*. *Ent. exp. & appl.*, 29: 177-188.
- **Glendinning** JI & Hills TT (1997). Electrophysiological evidence for two transduction pathways within a bitter-sensitive taste receptor. *J Neurophysiol* 78: 734–745.
- **Glendinning** JI, Brown H, Capoor M, Davis A, Gbedemah A & Long E (2001). A peripheral mechanism for behavioral adaptation to specific "bitter" taste stimuli in an insect. *J Neurosci* 21: 3688–3696.

- **Gothilf** S, Galun R & Bar-Zeev M (1971). Taste reception in the Mediterranean fruit fly: Electrophysiological and behavioural studies. *Journal of Insect Physiology*. Volume 17, Issue 7, July 1971, Pages 1371-1384
- **Grunert** H (1995). Eiablageverhalten und Substratnutzung von *Erythromma najas* (Odonata, Coenagrionidae). *Braunschweiger Naturkundliche Schriften* 4, 769-794.
- **Guiso** M, Marra C (2005). Highlights in oleuropein aglycone structure, *Natural Product Res.* 19(2):105-109.
- **Gutierrez-Rosales** F, Romero MP, Casanovas M, Motilva MJ, Minguez-Mosquera MI. (2012). β -Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4348-4358.
- **Hallem** EA, Dahanukar A & Carlson JR (2006). Insect odor and taste receptors. *Annu Rev Entomol* 51: 113-135.
- **Hanson** FE & Dethier VG (1973). Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Insect Physiol* 19: 1019-1034.
- **Haukioja** E, Suomela J & Neuvonen S (1985). Long-term inducible resistance in birch foliage: triggering cues and efficacy on a defoliator. *Oecologia*, Vol.65, pp. 363-369.
- **Higuchi** R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. Sep;11(9):1026-30
- **Hood Henderson** DE (1982). Fine structure and neurophysiology of a gustatory sensillum on the ovipositors of *Metasyrphus venablesi* and *Eupeodes volucris* (Diptera: Syrphidae). *Canadian Journal of Zoology* 60, 3187-3195.
- **Hudgins** JW, Christiansen E & Franceschi VR.(2003). Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. *Tree Physiol.*, Vol.23, pp. 361-371.
- **Iannotta** N, Monardo D & Perri L (2002). Relazione tra contenuto e localizzazione dell'oleuropeina nella drupa e attacco di *Bactrocera oleae* (Gmel.), *Atti Convegno Internazionale di Olivicoltura*. Spoleto, 2002, pp. 361-366.
- **Iannotta** N, Monardo D, Perri E & Perri L (2001). Comportamento di diverse cultivar di olivo nei confronti degli attacchi di *Bactrocera oleae* (Gmel.) e correlazione con la quantità di oleuropeina presente nelle drupe, *Atti Convegno "Biodiversità e sistemi ecocompatibili"*, Caserta, 2001, pp. 649-653.
- **Ivana Generalić Mekinić**, Gotovac M, Danijela Skroza, Ljubenković I, Burčul F, Višnja Katalinić (2014). Effect of the extraction solvent on the oleuropein content and antioxidant properties of olive leaf (cv. Oblica, Lastovka and Levantinka) extracts. *Croatian journal of food science and technology*, Vol.6 No.1 Srpanj 2014.
- **Jiang** XJ, Ning C, Guo H, Jia YY, Huang LQ, Qu MJ et al. (2015). A gustatory receptor tuned to D-fructose in antennal sensilla chaetica of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 60: 39-46.
- **Jiao** Y, Moon SJ, Wang X, Ren Q & Montell C (2008). Gr64f is required in combination with other gustatory receptors for sugar detection in *Drosophila*. *Curr Biol* 18: 1797-1801.
- **Jiao-Jiao** Y, Cheng-Zhang W, Jian-Zhong Y, Ran T & Yu-Si Z (2015). Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europaea* (Olive) Leaf Extract and Antioxidant Activities, *Molecules* 2015, 20(2), 2903-2921.
- **Jones** WD, Cayirlioglu P, Kadow IG & Vosshall LB (2007). Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* 445: 86-90.
- **Joseph** RM & Carlson JR (2015). *Drosophila* Chemoreceptors: A molecular Interface between the Chemical World and the Brain. *CellPress*.
- **Karlson** P & Lüscher M (1959). 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* 183, 55-56
- **Koprivnjak** O, Dminic I, Kosic U, Majetic V, Godena S & Valencic V (2010). Dynamics of oil quality parameters changes related to olive fruit fly attack. *Europ J Lip Sci Tech*, 112(9):1033-1040.
- **Kramer** JK (2001). Omiga™: A PC-based sequence analysis tool. *Molecular Biotechnology*. September 2001, Volume 19, Issue 1, pp 97-106

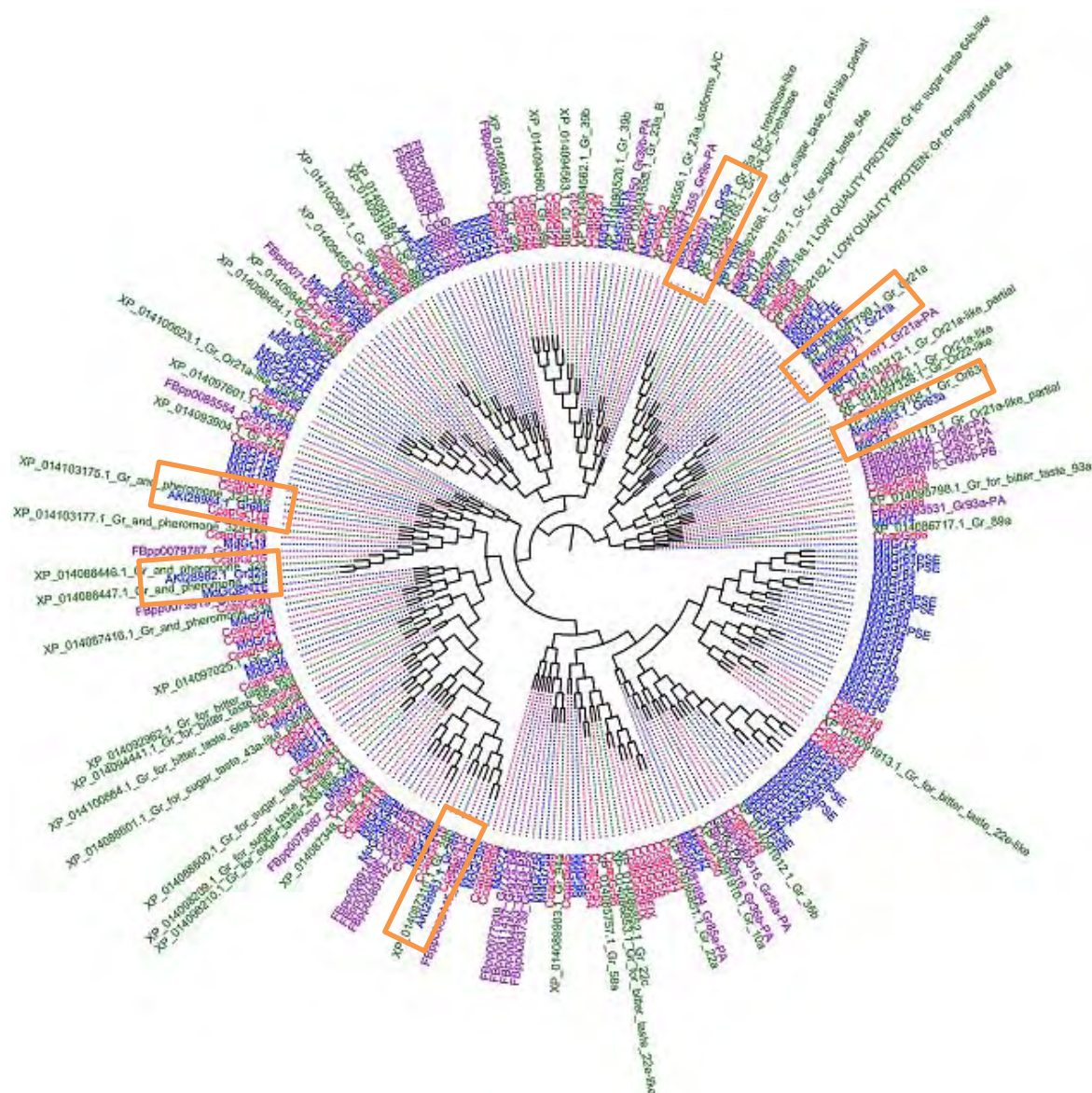
- **Kwon** JY, Dahanukar A, Weiss LA & Carlson JR (2007). The molecular basis of CO₂ reception in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 104: 3574-3578.
- **La Rocca** A, Fanti P, Romano VA, Marsicovetere E, Isidoro N, Romani R, Ruschioni S, Pennacchio F & Battaglia D (2007). Functional bases of host acceptance behaviour in the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. Physiological Entomology 32, 305-312.
- **Le Ralec** A, Rabasse JM & Wajnberg E (1996). Comparative morphology of the ovipositor of some parasitic hymenoptera in relation to characteristics of their hosts. The Canadian Entomologist 128, 413-433.
- **Liman** ER, Zhang YV & Montell C (2014). Peripheral coding of taste. Neuron 81: 984-1000.
- **Ling** F, Dahanukar A, Weiss LA, Kwon JY & Carlson JR (2014). The molecular and cellular basis of taste coding in the legs of *Drosophila*. J Neurosci, 34:7148-7164.
- **Livak** KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.
- **Ma** WC (1972). Dynamics of feeding responses in *Pieris brassicae* Linn as a function of chemosensory input: a behavioural, ultrastructural and electrophysiological study. Ed. Veenman, H. and Zonen, B.V. In Meded. Landbouwhoghe school Wageningen, 72: 1-162. Communications Agricultural University Wageningen, Netherland.
- **Maher** N, Thiéry D & Städler E (2006). Oviposition by *Lobesia botrana* is stimulated by sugars detected by contact chemoreceptors. Physiological Entomology 31, 14-22.
- **Martens** A (1992). Egg deposition rates and duration of oviposition in *Platycnemis pennipes* (Pallas) (Insecta: Odonata). Hydrobiologia 230, 63-70.
- **Martens** A (1993). Influence of conspecifics and plant structures on oviposition site selection in *Pyrrhosoma nymphula* (Sulzer) (Zygoptera: Coenagrionidae). Odonatologica 22, 487-494.
- **Martens** A (1994). Field experiments on aggregation behaviour and oviposition in *Coenagrion puella* (L.) (Zygoptera: Coenagrionidae). Advances in Odonatology 6, 49-58.
- **Miyamoto** T, Slone J, Song X & Amrein H (2012). A fructose receptor functions as a nutrient sensor in the *Drosophila* brain. Cell 151: 1113-1125.
- **Nardi** F, Carapelli A, Dallai R, Frati F (2003). The mitochondrial genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. Insect Mol. Biol. 12:605-11.
- **Nardi** F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK & Frati F (2005). Population structure and colonization history of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Mol. Ecol. 14:2729-38.
- **Neuenschwander** P, Michelakis S (1981). Olive fruit drop caused by *Dacus oleae* (Gmel) (Dipt., Tephritidae). J. Appl. Entomol. 91:193-205.
- **Neuenschwander** P, Michelakis S, Holloway P & Berchtold W (1985). Factors affecting the susceptibility of fruits of different olive varieties to attack by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt., Tephritidae). J. Appl. Entomol. 100:174-88.
- **Nordstrom** KJ, Almen MS, Edstam MM, Fredriksson R & Schioth HB (2011). Independent HHsearch, Needleman-Wunsch-based and motif analyses reveals the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families. Mol Biol Evol. 2011;28:2471-2480.
- **Panizzi** LM, Scarpati JM & Oriente EG (1960). Costituzione della oleuropeina, glucoside, glicoside amaro e ad azione ipotensiva dell' olivo", Org. Prep. Proc. Int. 4:97-104.
- **Peñalva-Arana** DC, Lynch M & Robertson HM (2009). The chemoreceptor genes of the waterflea *Daphnia pulex*: many Grs but no Ors. BMC Evolutionary Biology 9:79. doi: 10.1186/1471-2148-9-79
- **Pfaffl** MW in: Real-time PCR. Published by International University Line (Editor: T. Dorak), p 63-82 (2006).
- **Popescu** A, Couton L, Almaas TJ, Rospars JP, Wright GA, Marion-Poll F et al. (2013). Function and central projections of gustatory receptor neurons on the antenna of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 199: 403-416.
- **Rapoport** Hava FR, Fabbri A & Sebastiani L (2016). Olive biology: chapter

- **Renwick** JAA (1989). Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia* 45: 223–228.
- **Rice** MJ (1976). Contact chemoreceptors on the ovipositor of *Lucinia cuprina* (Wied.), the Australian sheep blowfly. *Australian Journal of Zoology* 24, 353–360.
- **Robert** PA (1959). Les libellules (Odonates). Delachaux & Niestlé, Neuchâtel, Paris.
- **Robertson** HM, Warr CG & Carlson JR (2003). Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14537–14542. doi: 10.1073/pnas.2335847100.
- **Sagri** E, Koskinioti P, Gregoriou ME, Tsoumani KT, Bassiakos YC & Mathiopoulou KD (2017). Housekeeping in Tephritid insects: the best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly. *Sci Rep.* 2017; 7: 45634.
- **Şahin** S, Ahmed Malik NS, Perez JL & Brockington JE (2012). Seasonal Changes of Individual Phenolic Compounds in Leaves of Twenty Olive Cultivars Grown in Texas, *J. Agric. Sci. Technol. B*, 2, 242–247.
- **Sato** K, Tanaka K & Touhara K (2011). Sugar-regulated cation channel formed by an insect gustatory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11680–11685.
- **Scott** K, Brady RJ, Cravchik A, Morozov P, Rzhetsky A, Zuker C & Axel R (2001). A chemosensory gene family encoding candidate gustatory and olfactory receptors in *Drosophila*. *Cell* 104, 661–673.
- **Seok** JM, Youngseok L, Yuchen J & Craig M (2009). A *Drosophila* gustatory receptor essential for aversive taste and inhibiting male-to-male courtship. *Current Biology* 19, 1623–1627
- **Silva** S, Gomes L, Leitão F, Bronze M, Coelho AV & Vilas Boas L (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry, *Grasas Aceites* 61, 157–164.
- **Slone** J, Daniels J & Amrein H (2007). Sugar receptors in *Drosophila*. *Curr Biol* 17: 1809–1816.
- **Smith** RF & Reynolds HT (1966). Principles, definitions and scope of integrated pest control. *Proc. FAO Symposium on Integrated Pest Control* 1: 11–17).
- **Solinas** M, Rebora M, De Cristofaro A, Rotundo G, Girolami G, Mori N & Di Bernardo A (2001). Functional morphology of *Bactrocera oleae* Gmel. (Diptera: Tephritidae) tarsal chemosensilla involved in interactions with the host-plant, *Entomologica, Bari*, 35: 103–123.
- **Sonnhammer** EL, von Heijne G & Krogh A (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 1998;6:175–82.
- **Stadler** E, Ernst B, Hurter J & Boller Ernst (1994). Tarsal contact chemoreceptor for the host marking pheromone of the cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*: responses to natural and synthetic compounds. *Physiol. Entomol.* 19, 139–151.
- **Stange** G & Wong C (1993). Moth response to climate. *Nature* 365: 699.
- **Stange** G (1997). Effects of changes in atmospheric carbon dioxide on the location of hosts by the moth, *Cactoblastis cactorum*. *Oecologia* 110: 539–545.
- **Strausfeld** NJ (1976). Atlas of insect brain. Springer- Verlag Berlin Heidelberg (Book).
- **Suh** GS, Wong AM, Hergarden AC, Wang JW, Simon AF, Benzer S, Axel R & Anderson DJ (2004). A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature*: 854–859.
- **Tamendjari** A, Angerosa F, Mettouchi S & Bellal MM (2009). The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil
- **Thein** SL & Wallace RB (1986). In Human genetic disorders: a practical approach (ed. K.E. Davis), p33–50 IRL Press, Herndon, Virginia.
- **Thom** C, Guerenstein PG, Mechaber WL & Hildebrand JG (2004). Floral CO₂ reveals flower profitability to moths. *J Chem Ecol* 30: 1285–1288.
- **Thorne** N, Chromey C, Bray S, & Amrein H (2004). Taste perception and coding in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 14, 1065–1079.
- **Tristram** D. Wyatt (2003). Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste. University of Oxford. Cambridge University Press.

- **Tzanakakis** ME (2006). Insects and Mites Feeding on Olive: Distribution, Importance, Habits, Seasonal Development and Dormancy. Leiden: Brill Acad. Publ. 182 pp.
- **Uceda** M & **Hermoso** M (1997). La calidad del aceite de olive. In EL cultivo del olivo; Barranco D, R Fernandez-Escobar, L Rallo, Eds, Junta de Andalucia: Seville, Spain.
- **Van Lenteren** JC, Ruschioni S, Romani R, van Loon JJ, Qiu YT, Smid HM, Isidoro N & Bin F (2007). Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. Arthropod Structure & Development 36, 271-276.
- **Van Loon** JJA & Schoonhoven LM (1999). Specialist deterrent chemoreceptors enable Pieris caterpillars to discriminate between chemically different deterrents. Entomol Exp Appl 91: 29-35.
- **Veer** WLC, U.S. Patent 3,033,877.
- **Vekiari** SA (2001). Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου και η σημασία τους στην ποιότητά του, Χημικά Χρονικά, Φεβρ. (2): 45-48.
- **Vogt** RG & Riddiford LM (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. Nature. 1981 Sep 10-16;293(5828):161-3.
- **Vosshall** LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A & Axel R (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. Cell 96:725-736. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80582-6.
- **Waladde** SM (1983). Chemoreception of adult stem-borers: tarsal and ovipositor sensilla on *Chilo partellus* and *Eldana saccharina*. International Journal of Tropical Insect Science 4, 159-165.
- **Wang** Z, Singhvi A, Kong P & Scott K (2004). Taste representations in the *Drosophila* brain. Cell 117, 981-991.
- **Wanner** KW & Robertson HM (2008). The gustatory receptor family in the silkworm moth *Bombyx mori* is characterized by a large expansion of a single lineage of putative bitter receptors. Insect Mol Biol 17: 621-629.
- **Watson** JD, Caudy AA, Myers RM & Witkowski JA (2007). Ανασυνδυασμένο DNA: Γονίδια και Γονιδιώματα – Μία συνοπτική παρουσίαση. Τρίτη αγγλική/Πρώτη ελληνική έκδοση, Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
- **Weiss** LA, Dahanukar A, Kwon JY, Banerjee D & Carlson JR (2011). The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. Neuron, 69:258-272. 2.
- **Whitehead** SR, Bowers MD. (2013). Evidence for the adaptive significance of secondary compounds in vertebrate-dispersed fruits. Am. Nat. 182, 563-577.
- **Wicher** D (2015). Olfactory Signaling in Insects, (Chapter Two, Book).
- **Wildermuth** H (1993). Habitat selection and oviposition site recognition by the dragonfly *Aeshna juncea* (L.): an experimental approach in natural habitats (Anisoptera: Aeshnidae). Odonatologica 22, 27-44.
- **Xu** W, Zhang HJ & Anderson A (2012). A sugar gustatory receptor identified from the foregut of cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. J Chem Ecol 38: 1513-1520.
- **Yao** CA & Carlson JR (2010). Role of G-proteins in odorsensing and CO₂-sensing neurons in *Drosophila*. J Neurosci 30: 4562-4572.
- **Zhang** HJ, Anderson AR, Trowell SC, Luo AR, Xiang ZH & Xia QY (2011). Topological and functional characterization of an insect gustatory receptor. PLoS ONE 6: e24111.
- **Zhou** X, Slone JD, Rokas A, Berger SL, Liebig J, Ray A et al. (2012). Phylogenetic and transcriptomic analysis of chemosensory receptors in a pair of divergent ant species reveals sex-specific signatures of odor coding. PLoS Genet 8: e1002930.
- Εικόνα 16: Andy Vierstraete, 1999.
- Εικόνα 4: <http://www.spel.gr/index.php/νεα/blog/341-επίδραση-της-ορθολογικής-λίπανσης-στην-καλλιέργεια-ελιάς>
- <http://www.foodbites.eu/j15/el/trofima/food-basics/elia-ladi/797-oliveoil>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152613>

7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

7.1 Φυλογενετικό δέντρο



Εικόνα 27. Φυλογενετικό δέντρο ανάμεσα στους οργανισμούς *Bactrocera oleae*, *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis capitata*, *Musca domestica* & *Drosophila melanogaster* [Bootstrap 500, pairwise deletion].

Στο παραπάνω φυλογενετικό δέντρο απεικονίζονται οι σχέσεις μεταξύ των οργανισμών *Bactrocera oleae*, *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis capitata*, *Musca domestica* και *Drosophila melanogaster*. Χρησιμοποιώντας το *Bactrocera dorsalis*, διαπιστώθηκε ότι όλα τα γευστικά γονίδια του *Bactrocera oleae* που επιλέχθηκαν στην παρούσα έρευνα ήταν, πράγματι, ειδο-ειδικά. Σε πορτοκαλί πλαίσιο διαφαίνονται τα γονίδια του *Bactrocera dorsalis* προς πιο εύκολη ανάγνωση του φυλογενετικού δέντρου.

7.2 Εκκινητές

Εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε	Νουκλεοτιδική αλληλουχία
Gr22e-like_XM_014231378_F	AAATGGCTCAACTGTTATTGGC
Gr22e-like_XM_014231378_R	TTGGTTTGCTTGTGATCTTTGA
Gr39b_XM_014235045_F	GCTTTGTGCTTTATTAACGGT
Gr39b_XM_014235045_R	TAGAATTCGTAAACACCCGATA
Gr93a_XM_014240323_F	TCCTGGGACGAACATTTGTAATA
Gr93a_XM_014240323_R	GCAGTCCTGTATCTTCCACAA
Gr21a_XM_014245698_F	GGCTGTGTGCGTCTTCT
Gr21a_XM_014245698_R	CGGCGATCAGAATCGTTGA
Gr21a-2_XM_014245148_F	CATCAGTTTATTGTTACGCA
Gr21a-2_XM_014245148_R	CGTCCACATATTCTTAAAGATAGC
Gr22e_XM_014236438_F	CGGTTACTATTGGGTGGTCTC
Gr22e_XM_014236438_R	GACAATCATACTTGCCACCAAC

7.2.1 Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 53 γονιδίων που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς του *B. oleae*

>XM_014245747.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625926),

>XM_014238429.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 57a (LOC106619776), mRNA

>>XM_014247700.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a-like (LOC106627548), mRNA

>XM_014239629.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 63a (LOC106620951), mRNA

>XM_014230282.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 58a (LOC106614499), mRNA

>XM_014247702.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a-like (LOC106627551), mRNA

>XM_014230971.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a (LOC106614996), transcript variant X1, mRNA

>XM_014231377.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 22c (LOC106615239), mRNA

>XM_014231376.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 22a (LOC106615238), mRNA

>XM_014231242.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 89a (LOC106615154), mRNA

>XM_014230972.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 32a (LOC106614996), transcript variant X2, mRNA

>XM_014231835.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 28b (LOC106615562), mRNA

>XM_014231378.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106615240), mRNA

>XM_014231873.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 28a (LOC106615595), mRNA

>XM_014239081.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 23a, isoforms A/C (LOC106620555), mRNA

>XM_014239080.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 23a, isoform B (LOC106620553), mRNA

>XM_014238966.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106620458), mRNA

>XM_014237723.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 98b (LOC106619573), mRNA

>XM_014237722.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 98b (LOC106619572), mRNA

>XM_014237487.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 66a (LOC106619412), mRNA

>XM_014236707.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 64a (LOC106618820), mRNA

>XM_014236705.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 5a for trehalose-like (LOC106618817), mRNA

>XM_014236693.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 64b-like (LOC106618806), mRNA

>XM_014236692.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 64e (LOC106618805), mRNA

>XM_014236691.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 64f-like (LOC106618804), partial mRNA

>XM_014236690.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 5a for trehalose (LOC106618803), mRNA

>XM_014236438.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 22e-like (LOC106618635), mRNA

>XM_014236437.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 36b (LOC106618634), mRNA

>XM_014236435.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 10a (LOC106618632), mRNA

>XM_014235045.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106617681), mRNA

>XM_014234428.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 94a (LOC106617318), mRNA

>XM_014233126.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106616462), partial mRNA

>XM_014231941.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and pheromone receptor 33a (LOC106615631), mRNA

>XM_014233125.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106616461), mRNA

>XM_014245737.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625916), partial mRNA

>XM_014245698.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625878), partial mRNA

>XM_014245389.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 66a-like (LOC106625559), partial mRNA

>XM_014245148.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a-like (LOC106625323), partial mRNA

>XM_014245112.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 98b (LOC106625288), partial mRNA

>XM_014242989.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 8a-like (LOC106623458), mRNA

>XM_014242987.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor 8a (LOC106623457), mRNA

>XM_014242735.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106623283), transcript variant X2, mRNA

>XM_014242734.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for sugar taste 43a-like (LOC106623283), transcript variant X1, mRNA

>XM_014242324.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 21a (LOC106622974), mRNA

>XM_014242126.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 47b (LOC106622820), mRNA

>XM_014241851.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory and odorant receptor 22-like (LOC106622618), mRNA

>XM_014240323.1 PREDICTED: Bactrocera oleae gustatory receptor for bitter taste 93a (LOC106621446), mRNA

>XM_014239088.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620561), mRNA

>XM_014241550.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 59f (LOC106622393), mRNA

>XM_014239087.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620560), mRNA

>XM_014239086.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620559), mRNA

>XM_014239085.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 39b (LOC106620558), mRNA

>XM_014239082.1 PREDICTED: Bactrocera oleae putative gustatory receptor 2a (LOC106620556), mRNA

7.2.2 Αμινοξικές αλληλουχίες των 53 γονιδίων που κωδικοποιούν γευστικούς υποδοχείς του *B. oleae*

>XP_014101222.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like [Bactrocera oleae]

>XP_014093904.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 57a [Bactrocera oleae]

>XP_014103175.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a-like [Bactrocera oleae]

>XP_014095104.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 63a [Bactrocera oleae]

>XP_014085757.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 58a [Bactrocera oleae]

>XP_014103177.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a-like [Bactrocera oleae]

>XP_014086446.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a [Bactrocera oleae]

>XP_014086852.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 22c [Bactrocera oleae]

>XP_014086851.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 22a [Bactrocera oleae]

>XP_014086717.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 89a [Bactrocera oleae]

>XP_014086447.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 32a [Bactrocera oleae]

>XP_014087310.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 28b [Bactrocera oleae]

>XP_014086853.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 22e-like [Bactrocera oleae]

>XP_014087348.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 28a [Bactrocera oleae]

>XP_014094556.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 23a, isoforms A/C [Bactrocera oleae]

>XP_014094555.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 23a, isoform B [Bactrocera oleae]

>XP_014094441.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 66a-like [Bactrocera oleae]

>XP_014093198.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 98b [Bactrocera oleae]

>XP_014093197.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 98b [Bactrocera oleae]

>XP_014092962.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 66a [Bactrocera oleae]

>XP_014092182.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: gustatory receptor for sugar taste 64a [Bactrocera oleae]

>XP_014092180.1 PREDICTED: gustatory receptor 5a for trehalose-like [Bactrocera oleae]

>XP_014092168.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: gustatory receptor for sugar taste 64b-like [Bactrocera oleae]

>XP_014092167.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 64e [Bactrocera oleae]

>XP_014092166.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 64f-like, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014092165.1 PREDICTED: gustatory receptor 5a for trehalose [Bactrocera oleae]

>XP_014091913.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 22e-like [Bactrocera oleae]

>XP_014091912.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 36b [Bactrocera oleae]

>XP_014091910.1 PREDICTED: gustatory receptor 10a [Bactrocera oleae]

>XP_014090520.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]

>XP_014089903.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 94a [Bactrocera oleae]

>XP_014088601.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014087416.1 PREDICTED: gustatory and pheromone receptor 33a [Bactrocera oleae]

>XP_014088600.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like [Bactrocera oleae]

>XP_014101212.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014101173.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014100864.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 66a-like, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014100623.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a-like, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014100587.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 98b, partial [Bactrocera oleae]

>XP_014098464.1 PREDICTED: gustatory receptor 8a-like [Bactrocera oleae]

>XP_014098462.1 PREDICTED: gustatory receptor 8a [Bactrocera oleae]

>XP_014098210.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like isoform X2 [Bactrocera oleae]

>XP_014098209.1 PREDICTED: gustatory receptor for sugar taste 43a-like isoform X1 [Bactrocera oleae]

>XP_014097799.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 21a [Bactrocera oleae]

>XP_014097601.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 47b [Bactrocera oleae]

>XP_014097326.1 PREDICTED: gustatory and odorant receptor 22-like [Bactrocera oleae]

>XP_014095798.1 PREDICTED: gustatory receptor for bitter taste 93a [Bactrocera oleae]

>XP_014094563.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]

>XP_014097025.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 59f [Bactrocera oleae]

>XP_014094562.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]

>XP_014094561.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]

>XP_014094560.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 39b [Bactrocera oleae]

>XP_014094557.1 PREDICTED: putative gustatory receptor 2a [Bactrocera oleae]